

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Jiří Krupička

**Studium esenciality genu *glmM* kódujícího fosfoglukozaminmutázu  
*Streptococcus pneumoniae***

**Analysis of essentiality of *glmM* gene coding for phosphoglucosamine  
mutase of *Streptococcus pneumoniae***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Pavel Branny, CSc.

Praha, 2014

Tato diplomová práce byla vypracována v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky v Laboratoři buněčné signalizace pod odborným vedením **RNDr. Pavla Brannyho, CSc.**

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 14.8. 2014

.....  
Jiří Krupička

Práce vznikla v období říjen 2012 - srpen 2014 v rámci grantových projektů P302/12/0256 a P207/12/1568 za podpory Grantové agentury České republiky.

### **Poděkování:**

Nejprve bych chtěl poděkovat svému školiteli Pavlu Brannymu za odborné vedení práce a cenné rady při jejím zpracování, dále svému konzultantovi Aleši Ulrychovi a Karolíně, Nele, Denise, Lindě, Janě, Olivě, Zuzce, Andreovi, Silvii, Alici a dalším kolegům z Mikrobiologického ústavu rovněž za cenné rady, postřehy a přátelskou atmosféru.

Dále bych chtěl poděkovat svým rodičům a přátelům za podporu a trpělivost.

## **Studium esenciality genu *glmM* kódujícího fosfoglukozaminmutázu *Streptococcus pneumoniae***

Fosfoglukozaminmutáza (GlmM) představuje enzym hrající roli v biosyntéze buněčné stěny bakterií. Hlavním záměrem této diplomové práce bylo zjistit, zda je gen *glmM* esenciální pro životaschopnost *Streptococcus pneumoniae*. Za tímto účelem jsme vytvořili merodiploidní kmen obsahující dvě kopie *glmM* - nativní gen a jeho ektopickou kopii pod kontrolou inducibilního zinkového promotoru. Deleci nativního genu *glmM* jsme vytvořili mutantní kmen, u něhož jsme analyzovali životaschopnost a fenotyp v médiu s různými koncentracemi zinečnatých iontů, induktoru exprese ektopické kopie *glmM*. Zjistili jsme, že životaschopnost mutantního kmene je striktně závislá na koncentraci induktoru v médiu a úbytek GlmM se u buněk projevuje výraznými morfologickými defekty a sklonem k lyzi. Prokázali jsme, že následné vyrovnění koncentrace induktoru v médiu na koncentraci odpovídající kontrolnímu vzorku komplementuje projevy úbytku GlmM. Tyto výsledky dokazují esencialitu *glmM* pro životaschopnost *S. pneumoniae*.

Dále jsme analyzovali, zda je pro funkčnost GlmM esenciální fosforylace na klíčových aminokyselinových zbytcích S99 a S101. Cílenou mutagenezí jsme připravili čtyři varianty plazmidů nesoucích *glmM* kódující záměny serinových zbytků za alanin nebo kyselinu glutamovou a transformovali je za vzniku čtyř merodiploidních kmenů, v nichž jsme se pokusili provést deleci nativního genu *glmM*. Výsledky naznačují, že fosforylace na obou serinových zbytcích je pro funkčnost GlmM esenciální.

**Klíčová slova:** *Streptococcus pneumoniae*, esencialita, mutageneze, komplementace, biosyntéza buněčné stěny

## **Analysis of essentiality of *glmM* gene coding for phosphoglucosamine mutase of *Streptococcus pneumoniae***

Phosphoglucosamine mutase (GlmM) is an enzyme of bacterial cell wall biosynthesis. The main aim of this thesis was to find out, whether gene *glmM* is essential for viability of *Streptococcus pneumoniae*. Therefore, we prepared merodiploid strain containing two copies of *glmM*; the genomic gene and ectopic copy under control of zinc inducible promoter. Subsequently, depletion strain was prepared by deletion of genomic copy of *glmM*. This strain was further used for analysis of viability and phenotype features in the medium containing various concentrations of zinc ions, an inducer of ectopic *glmM* expression. We found out, that the viability of this strain was strictly dependent on the concentration of inducer and further, that depletion of GlmM resulted in remarkable morphological defects. The rescue of mutant strain was observed after addition of inducer up to the level of the control sample. These results have provided the evidence of *glmM* essentiality for *S. pneumoniae* viability.

Furthermore, we analyzed, whether phosphorylation of key amino acid residues, S99 and S101, is essential for GlmM functionality. Four different strains were prepared by means of site-directed mutagenesis expressing *glmM* with substitutions of key serine residues for alanine or glutamic acid. Since deletion of chromosomal locus in these strains failed, our results suggests that phosphorylation of both serine residues is essential for GlmM activity.

**Key words:** *Streptococcus pneumoniae*, essentiality, mutagenesis, complementation, cell wall biosynthesis

# Obsah

<b>1. Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>2. Literární přehled.....</b>	<b>11</b>
2.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	11
2.1.1 Historické souvislosti .....	12
2.1.2 Kompetence <i>S. pneumoniae</i> .....	13
2.1.3 Patogenita <i>S. pneumoniae</i> .....	15
2.2 Fosforylace u bakterií a přenos signálu.....	18
2.2.1 Fosfoenolpyruvát-dependentní fosfotransferázový systém.....	20
2.2.2 Dvousložkové systémy (TCSs) .....	21
2.2.3 Bakteriální Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu (eSTKs).....	23
2.2.4 PASTA doména.....	27
2.3 Proteinkináza StkP <i>S. pneumoniae</i> .....	31
2.3.1 Přehled substrátů proteinkinázy StkP <i>S. pneumoniae</i> .....	33
2.4 Fosfoglukozaminmutáza (GlmM).....	37
2.4.1 Biosyntetická dráha UDP-N-acetylglukozaminu .....	38
2.4.2 Charakterizované fosfoglukozaminmutázy u bakteriálních zástupců .....	41
<b>3. Cíle práce .....</b>	<b>47</b>
<b>4. Materiál a metodika .....</b>	<b>48</b>
4.1 Materiál .....	48
4.1.1 Bakteriální kmeny.....	48
4.1.2 Vektory .....	48
4.1.3 Půdy a média.....	49
4.1.4 Pufry a roztoky.....	51
4.1.5 Chemikálie .....	52
4.1.6 Enzymy .....	54
4.1.7 Protilátky.....	55

4.1.8 Komerční soupravy a standardy .....	55
4.1.9 Počítačová analýza .....	55
4.1.10 Použité oligonukleotidy.....	56
4.2 Metodika .....	57
4.2.1 Manipulace s DNA .....	57
4.2.2 Manipulace s proteiny.....	62
4.2.3 Manipulace s <i>E. coli</i> .....	63
4.2.4 Manipulace se <i>S. pneumoniae</i> .....	65
4.2.5 Mikroskopie.....	67
4.2.6 Live/Dead barvení.....	67
<b>5. Výsledky .....</b>	<b>69</b>
5.1 Příprava merodiploidního kmene <i>S. pneumoniae</i> .....	70
5.1.1 Příprava vektoru .....	70
5.1.2 Transformace vektoru do chromozomu <i>S. pneumoniae</i> .....	73
5.1.3 Testování exprese proteinu GlmM-FLAG pod zinkovým promotorem .....	75
5.2 Příprava mutantního kmene <i>S. pneumoniae</i> $\Delta$ glmM/bgaA::P <sub>czcD</sub> -glmM-FLAG.....	77
5.2.1 Příprava konstruktů pro delecí nativního genu glmM <i>S. pneumoniae</i> .....	77
5.2.2 Příprava konstruktů pro delecí Janus kazety vložené na chromozomu <i>S. pneumoniae</i> .....	78
5.2.3 Transformace konstruktů pro delecí nativního genu glmM <i>S. pneumoniae</i> .....	79
5.3 Charakterizace mutantního kmene $\Delta$ glmM/bgaA::P <sub>czcD</sub> -glmM-FLAG.....	83
5.3.1 Růst mutantních kmenů Sp261 a Sp263 na pevném médiu .....	83
5.3.2 Růst mutantního kmene Sp261 v C+Y médiu .....	84
5.3.3 Růst a analýza morfologie kmenů Sp1 a Sp217 v C+Y médiu s různými koncentracemi ZnCl <sub>2</sub> .....	86
5.3.4 Růst, analýza morfologie a L/D barvení mutantního kmene Sp261 v C+Y médiu s různými koncentracemi ZnCl <sub>2</sub> .....	88
5.4. Cílená mutageneze genu glmM-FLAG.....	95
5.4.1 Příprava modifikovaných vektorů .....	95

5.4.2 Transformace modifikovaných vektorů do chromozomu <i>S. pneumoniae</i> za vzniku merodiploidních kmenů.....	98
5.4.3 Delece nativní kopie genu <i>glmM</i> .....	99
<b>6. Diskuze .....</b>	<b>101</b>
6.1 Esencialita fosfoglukozaminmutázy pro životaschopnost <i>S. pneumoniae</i> .....	101
6.2 Esencialita fosforylace serinových zbytků S99 a S101 pro funkčnost <i>GlmM S. pneumoniae</i> .....	106
<b>7. Souhrn .....</b>	<b>110</b>
<b>8. Seznam použité literatury .....</b>	<b>112</b>



## Seznam použitých zkratek

A <sub>260</sub> , A <sub>280</sub>	absorbance při vlnové délce 260, 280 nm
AK	aminokyselina
ADP	adenozindifosfát
ATP	adenozintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin
CSP	peptid stimulující kompetenci
DNA	deoxyribonukleová kyselina
eSTKs	Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu
eSTPs	Ser/Thr proteinfosfatázy eukaryotického typu
FLAG	FLAG-epitop
g	tíhové zrychlení
GFP	zelený fluorescenční protein
GlmM	fosfoglukozaminmutáza
JanusK	Janus kazeta
kb	kilobáze
kDa	kilodalton
L/D barvení	barvicí metoda rozlišující živé a mrtvé buňky
Mb	megabáze
OD <sub>600</sub>	optická denzita při vlnové délce 600 nm
PASTA	doména vyskytující se u penicilin vazebných proteinů a některých Ser/Thr proteinkináz eukaryotického typu
pb	páry bazí
PBP	penicilin vázající protein
PCR	polymerázová řetězová reakce
P <sub>czcD</sub>	inducibilní zinkový promotor
PEP	fosfoenolpyruvát
PTS	fosfotransferázový systém
PVDF	polyvinylidendifluorid
RNA	ribonukleová kyselina
RR	transkripční regulátor
S99	serin v pozici 99
S101	serin v pozici 101
S99A	záměna serinu v pozici 99 za alanin
S101A	záměna serinu v pozici 101 za alanin
S99E	záměna serinu v pozici 99 za kyselinu glutamovou
S101E	záměna serinu v pozici 101 za kyselinu glutamovou
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s SDS
TCS	dvousložkový systém
WT	divoký typ (wild type)

## 1. Úvod

V prostředí se musí jakákoliv buňka přizpůsobit neustále se měnícím podmínkám. Buňky, ať už se jedná o bakteriální či jiné, neustále přicházejí do styku s různými typy signálních molekul, mezi něž patří i látky produkované jejich vlastním metabolismem. Aby jednotlivé buňky i celé kolonie přežily, musejí odpovídajícím způsobem a zároveň s dostatečnou rychlostí na tyto signály reagovat a přizpůsobovat se tak proměnlivým podmínkám okolního prostředí. S těmito změnami se mohou vyrovnat díky tomu, že jsou vybaveny strukturami a mechanismy, které zprostředkovávají přenos signálu z vnějšího prostředí do nitra buňky. Schopnost rozpoznání signálu a jeho následného přenosu je tedy pro bakterie i jiné formy života k přežití nezbytná.

Přenos signálu v buňkách je zajišťován mimo jiné mechanismem fosforylace a defosforylace proteinů. Fosforylace představuje jednu z nejvýznamnějších posttranslačních modifikací proteinů. Uplatňuje se u prokaryot i eukaryot. Ke klíčovým enzymům, které fosforylaci katalyzují, patří ATP-dependentní enzymy proteinkinázy, které zprostředkovávají přenos fosfátové skupiny z molekuly ATP na hydroxyskupinu aminokyseliny serinu, threoninu (Ser/Thr proteinkinázy), tyrozinu (Tyr proteinkinázy), případně na dusík postranních řetězců histidinu (His proteinkinázy) nebo argininu (Arg proteinkinázy) svých substrátových proteinů. Tyto fosforylované substáty mohou být posléze převedeny do původního nefosforylovaného stavu pomocí enzymů proteinfosfatáz.

Přestože bylo u bakterií objeveno více typů fosforylačních systémů, mezi které patří například dvousložkové systémy (TCSs), dříve považované za hlavní signalizační systémy bakterií, dále fosfoenolpyruvát (PEP) - dependentní fosfotransferázový systém a některé neobvyklé kinázy, v poslední době se stále větší pozornost upíná k bakteriálním Ser/Thr proteinkinázám eukaryotického typu (eSTKs), jejichž katalytické domény jsou strukturně i funkčně podobné svým eukaryotickými protějškům a fosforylují substrátové proteiny účastníci se mnoha důležitých buněčných procesů včetně biosyntézy buněčné stěny nebo buněčného dělení. Rekonstrukce signálních drah a charakterizace substrátů proteinkináz, které v těchto drahách figurují, by umožnilo lépe porozumět bakteriální fyziologii.

*Streptococcus pneumoniae*, grampozitivní extracelulární lidský patogen, představuje ideální modelový organismus pro studium eSTKs a Ser/Thr proteinfosfatáz eukaryotického typu (eSTPs), neboť jeho genom obsahuje jeden gen kódující eSTK (StkP) a jeden k němu příslušný gen kódující eSTP (PhpP). Pro hlubší porozumění signálním drahám, které jsou

spjaty s proteinkinázou StkP, je identifikace a charakterizace jejích substrátových proteinů zcela zásadní. V dřívější studii, kde byly získané proteiny z kultur *S. pneumoniae* značeny *in vivo* pomocí  $^{33}\text{P}$ -ortofosfátu rozděleny pomocí dvojrozměrné gelové elektroforézy a následně analyzovány prostřednictvím hmotnostní spektrometrie, se podařilo jako jeden z potenciálních substrátů StkP identifikovat fosfoglukozaminmutázu (GlmM), enzym biosyntézy buněčné stěny. Kinázovou reakcí byla prokázána fosforylace GlmM proteinkinázou StkP *in vitro* (Nováková *et al.*, 2005).

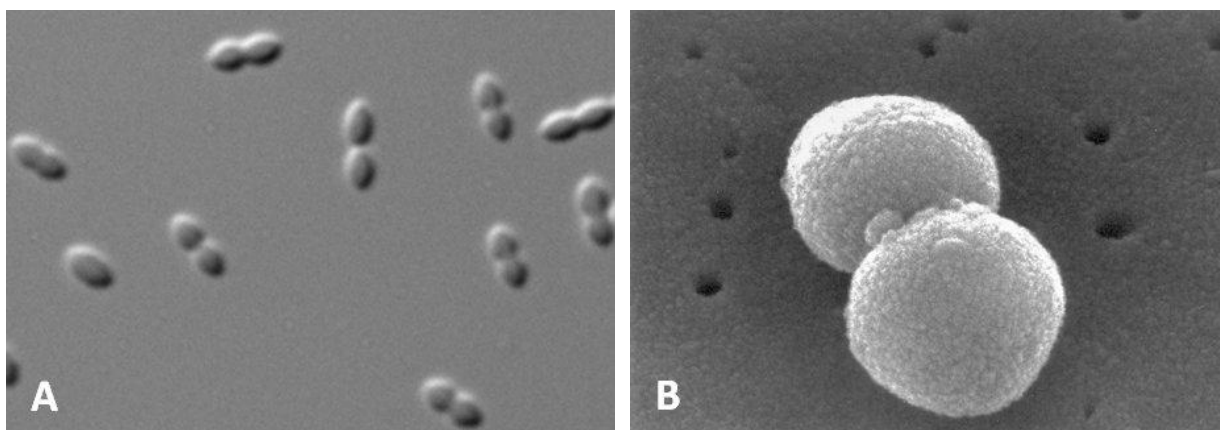
## 2. Literární přehled

### 2.1 *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae* je grampozitivní extracelulární lidský patogen, který se řadí do skupiny kataláza negativních koků. Vyskytuje se převážně v podobě diplokoků lancetovitého tvaru (Obr. 2.1). Jedná se o nesporogenní a nepohyblivou bakterii, která náleží do kmene *Firmicutes*, čeledi *Streptococcaceae*, rodu *Streptococcus*. Tato bakterie je fakultativně anaerobní, růstově poměrně náročná. Ideální podmínky k růstu má při teplotě 37°C a pH okolo 7, stejně jako většina lidských patogenů a kmenzálů. Na základě barevné změny krevního agaru, na který byla inokulována bakteriální kultura, se *S. pneumoniae* řadí mezi  $\alpha$ -hemolytické streptokoky, které produkují peroxid vodíku, což má za následek přeměnu hemoglobinu na verdoglobin. Na krevním agaru se to projeví zónou nazelenalého zbarvení obklopující kolonie streptokoka neboli tzv. viridací. Kromě  $\alpha$ -hemolytických streptokoků existují druhy, které se vyznačují  $\beta$ -hemolýzou, kdy dochází k úplné hemolýze a projasnění agaru (např. *S. pyogenes*, *S. agalactiae*) a  $\gamma$ -hemolytické (nebo též nehemolytické) druhy, které hemolýzu nezpůsobují a krevní agar zůstává beze změny (např. *S. bovis*). K rozlišení *S. pneumoniae* od ostatních  $\alpha$ -hemolytických streptokoků se používá optochinonový test, při kterém se využívá skutečnosti, že *S. pneumoniae* jako jediný z nich vykazuje citlivost k optochinonu, a tak v okolí disku napuštěného touto látkou nevyroste.

Tato bakterie vytváří dvě morfologické formy. Vyskytuje se buď v podobě neopouzdrěných kolonií s drsným povrchem, označované jako forma R (rough = drsný), nebo v podobě opouzdrěných hladkých kolonií jako forma S (smooth = hladký). Zatímco forma R není virulentní a kolonizuje sliznice horních cest dýchacích jako součást běžné mikroflóry, opouzdrěná forma S je virulentní a může způsobovat záněty středního ucha či nosohltanu nebo i závažná onemocnění jako pneumonie, meningitidy a sepse. I z tohoto důvodu je *S. pneumoniae* intenzivně studován, neboť způsobuje onemocnění zejména u malých dětí a rezistence k antibiotikům u této bakterie narůstá.

*S. pneumoniae* obsahuje cirkulární nukleoid o velikosti 2,0 - 2,2 Mb v závislosti na kmeni. Odlišnost velikostí genomu různých kmenů se může mimo jiné projevovat přítomností úseku o délce 7,5 kb, který kóduje geny pro tvorbu pouzdra (Hoskins *et al.*, 2001). Mezi osekvenované kmeny patří např. virulentní *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (Tettelin *et al.*, 2001) nebo nevirulentní *Streptococcus pneumoniae* R6 (Hoskins *et al.*, 2001). Genom zmíněných kmenů obsahuje 39,7 %, resp. 40 % GC párů. V genomu *S. pneumoniae* R6 bylo identifikováno 2043 potenciálních genů kódujících proteiny (Hoskins *et al.*, 2001).



**Obr. 2.1** *Streptococcus pneumoniae*:

**A)** Snímek *S. pneumoniae* ze světelného mikroskopu za použití Nomarského diferenciálního interferenčního kontrastu. Upraveno a převzato z archivu RNDr. Lindy Novákové, Ph.D., Laboratoř buněčné signalizace - Prokaryotická skupina, Mikrobiologický ústav AV ČR.

**B)** Snímek dvojice koků *S. pneumoniae* pořízený pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Prevzato z webových stránek Centers for Disease Control and Prevention, USA ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)) - Public Health Image Library.

### 2.1.1 Historické souvislosti

*S. pneumoniae* popsali v roce 1881 nezávisle na sobě Louis Pasteur (Francie) a George Miller Sternberg (USA). Bakterie dříve nesla název *Diplococcus pneumoniae* (López, 2004), ale později byla přejmenována na dnešní podobu. Zásadou britského bakteriologa Fredericka Griffitha byl v roce 1928 objeven proces transformace genetické informace poté, co na myších provedl experiment s dvěma kmeny *S. pneumoniae* reprezentujícími dvě základní morfologické formy (R a S). Pokud injikoval do myšího hostitele živou avirulentní R formu, myš neprokazovala známky infekce, v případě injikace živé virulentní S formy nepřežila, v případě teplotně denaturované S formy opět nedošlo k vývoji onemocnění. Kombinace živé R formy a denaturované S formy však způsobila úhyn zvířete, z jehož krve Griffith následně izoloval pouze virulentní S formu, což ho vedlo k domněnce, že z denaturované S formy musí docházet k přenosu nějaké látky, díky níž se buňky R formy změní na S formu. Tehdy však ještě nebylo známo, že nositelem genetické informace je DNA a tato neznámá substance byla označována jako tzv. „transformační princip“. Na Griffithův experiment později navázali Avery, MacLeod a McCarty, kteří v roce 1944 objasnili podstatu transformace a prokázali, že transformační substancí nesoucí genetickou informaci je DNA.

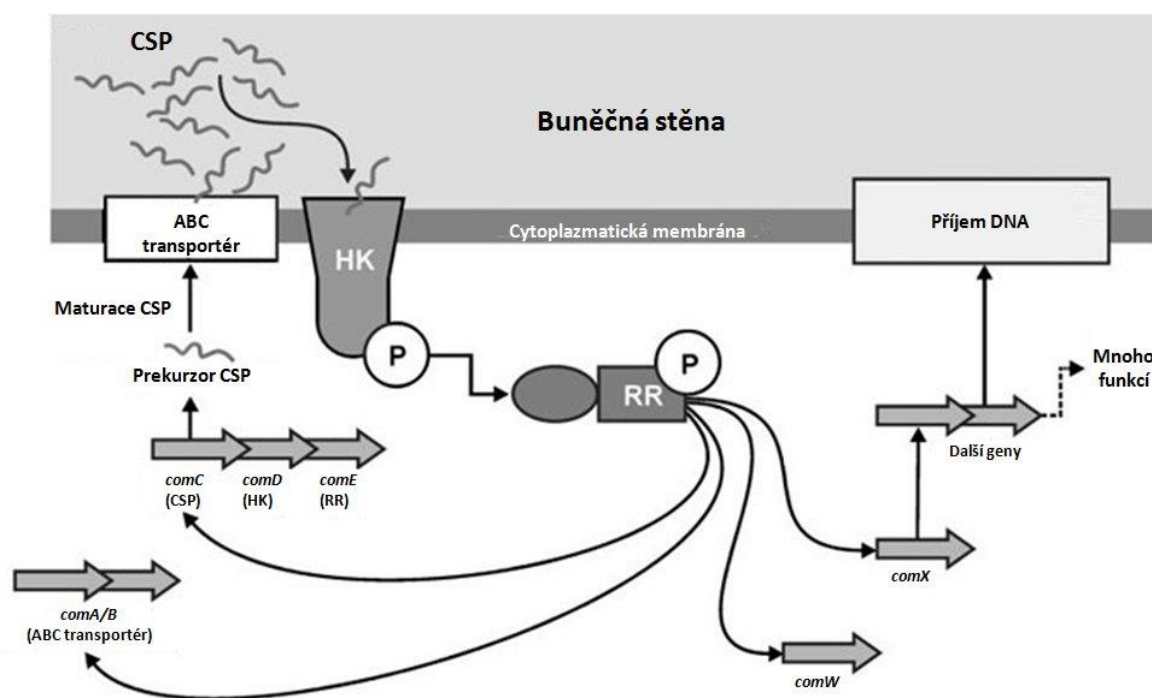
### 2.1.2 *Kompetence S. pneumoniae*

*S. pneumoniae* se vyznačuje vysokou schopností přirozené kompetence pro transformaci genetické informace. Tato schopnost výrazně přispívá k rozšiřování rezistence nejen k  $\beta$ -laktamovým, ale i jiným druhům antibiotik mezi různými kmeny této bakterie (Doern *et al.*, 1999). Vlastní stav kompetence nastává během exponenciální fáze růstu kultury v závislosti na teplotě, koncentraci kyslíku, pH a také na koncentracích manganatých i vápenatých iontů a fosfátu (Claverys a Havarstein, 2002). Regulace tohoto stavu je zajišťována systémem *quorum sensing*, kde jako signální molekula slouží solubilní heptadekapeptidový feromon CSP (Competence Stimulating Peptide; Obr. 2.2) (Havarstein *et al.*, 1995), jehož koncentrace je úměrná počtu buněk a signalizuje tak buněčnou hustotu v okolním prostředí. Po dosažení prahové hladiny CSP v okolí je v buňce indukován stav kompetence (Claverys a Havarstein, 2002). CSP je kódován genem *comC*, jenž je součástí lokusu *comCDE* (Havarstein *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 1997). Sekrece CSP z buňky do okolí probíhá pomocí ATP-dependentního ABC transportního systému ComAB s proteolytickou aktivitou, který je kódován geny *comAB*. ComAB se účastní maturace prekurzoru CSP a následné sekrece jeho sestřižené formy do vnějšího prostředí (Hui a Morrison, 1991; Hui *et al.*, 1995).

Genová výbava *S. pneumoniae* pro kompetenci zahrnuje přibližně 20 časných kompetenčních genů včetně hlavního regulačního operonu *comCDE*, genů *comAB* a *comX* sloužících k regulaci navození stavu kompetence a dále několik desítek pozdních kompetenčních genů zodpovídajících za příjem cizorodé DNA a její případnou rekombinaci (Peterson *et al.*, 2000). Regulaci genové exprese kompetenčních genů zajišťuje dvojice dvousložkových systémů (TCSs). První je systém ComDE, kde složka ComD představuje senzorovou His kinázu, zatímco složka ComE je příslušný transkripční regulátor (Pestova *et al.*, 1996) sloužící jako transkripční aktivátor (Ween *et al.*, 1999). O druhém TCS CiaRH (Guenzi *et al.*, 1994) je pojednáno níže v této kapitole. ComD registruje hladinu CSP v okolí buňky, následkem čehož dochází k autofosforylaci této His kinázy a posléze i k fosforylaci ComE (Pestova *et al.*, 1996). ComE je globální transkripční aktivátor časných kompetenčních genů *comAB*, *comCDE*, *comX* a *comW* (Cheng *et al.*, 1997; Ween *et al.*, 1999; Luo a Morrison, 2003; Luo *et al.*, 2004; Sung a Morrison, 2005). V regulaci kompetence se uplatňuje také proteinkináza StkP, která je globálním pozitivním regulátorem kompetence. Funkční StkP je nezbytná pro expresi genů *comCDE* (Echenique *et al.*, 2004). K aktivaci transkripce pozdních kompetenčních genů dochází nepřímo (Ween *et al.*, 1999) prostřednictvím alternativního sigma faktoru ComX, který zodpovídá za aktivaci transkripce

pozdních kompetenčních genů. Genom *S. pneumoniae* obsahuje gen kódující ComX ve dvou kopiích s označením *comX1* a *comX2* (Lee a Morrison, 1999; Luo a Morrison, 2003). ComW, produkt genu *comW*, je pozitivním regulátorem kompetence (Luo *et al.*, 2004), který podporuje aktivitu ComX a přispívá též k ochraně tohoto klíčového sigma faktoru před proteolýzou. ComW je esenciální pro aktivaci transkripce pozdních kompetenčních genů, ale indukce jeho exprese je na ComX nezávislá (Sung a Morrison, 2005).

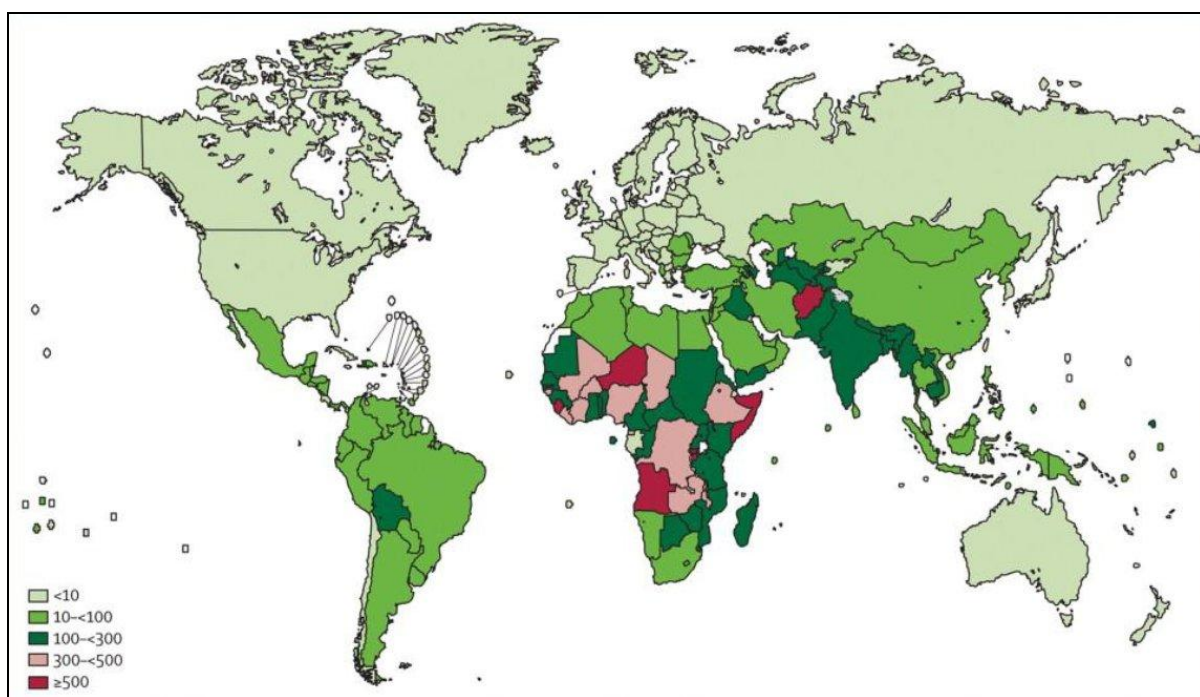
Negativní regulaci kompetence zajišťuje TCS, který nese označení CiaRH a skládá se ze senzorové His kinázy CiaH a transkripčního regulátoru CiaR (Guenzi *et al.*, 1994). Aktivovaný TCS CiaRH působí negativně na regulaci exprese genů *comCDE* (Echenique *et al.*, 2000; Mascher *et al.*, 2003), což způsobí to, že stav kompetence není indukován. Povaha signálu, který aktivuje His kinázu CiaH, však doposud nebyla objasněna.



**Obr. 2.2:** Regulace stavu kompetence u *S. pneumoniae*. Popis v textu kap. 2.1.2. ABC transportér na obrázku představuje ComAB, HK představuje His kinázu a RR její příslušný transkripční aktivátor v rámci TCS ComDE. TCS CiaRH není na obrázku zobrazen. Přeloženo a převzato z (Paterson *et al.*, 2006).

### 2.1.3 Patogenita *S. pneumoniae*

*S. pneumoniae* patří mezi nejzávažnější bakteriální patogeny, a to především u dětí do pěti let. Odhaduje se, že onemocnění způsobená touto bakterií si ročně na celém světě vyžádají přes 1,5 mil. obětí (López, 2004), z tohoto počtu tvoří 700 tis.-1 mil. dětí (O'Brien *et al.*, 2009). Vzhledem k tomu, že se tato bakterie vyskytuje na sliznicích horních cest dýchacích, je potenciálně patogenní pro lidi s oslabenou imunitou. Nejohroženějšími skupinami jsou malé děti, starší lidé a imunosuprimovaní pacienti. Přenos probíhá z člověka na člověka kapénkovou infekcí, přičemž místem vstupu je nejčastěji nosohltan. Infekce může být i endogenní a často vzniká po infekci jiným patogenem. Při endogenní nákaze dochází k rozšíření infekce z horních cest dýchacích. *S. pneumoniae* se může šířit do dolních cest dýchacích nebo do krve a v takovém případě může dojít k meningitidě či sepsi a vzniká nebezpečí fatálních následků. Celkově tato bakterie zodpovídá za více než polovinu případů zánětu středního ucha, 10-25 % případů pneumonií a 10 % meningitid s mortalitou dosahující 30 % (López, 2004). Nejhorší situace je v méně rozvinutých a rozvojových zemích (Obr. 2.3).



**Obr. 2.3:** Míra dětské mortality ve světě způsobená *S. pneumoniae* vztažená na 100 000 dětí mladších pěti let (HIV negativních) za rok. Přes 61 % těchto obětí (což odpovídá počtu mezi 316 000-501 000) pochází z deseti nejpostiženějších zemí světa, z nichž všechny leží v Africe nebo Asii. Převzato z (O'Brien *et al.*, 2009).



### 2.1.3.1 Virulenční faktory

Nejvýznamnější virulenční faktory *S. pneumoniae* představují polysacharidové pouzdro, které je nejvýraznějším antigenem a rozlišuje se podle něj více než 90 sérotypů této bakterie (Hoskins *et al.*, 2001), enzym neuraminidáza a cytoplazmatický toxin pneumolyzin.

Polysacharidové pouzdro představuje hlavní faktor virulence *S. pneumoniae*. Nalézá se vně buněčné stěny a většinou obklopuje celé diplokoky. Jeho přítomnost poskytuje bakterii ochranu před fagocytózou hostitelskými makrofágy a usnadňuje kolonizaci slizničních povrchů, může též přispívat k odolnosti této bakterie vůči antibiotikům nebo nepříznivým podmínkám okolního prostředí. Vytváří se pouze u virulenčních kmenů, což sehrálo roli při pokusu, který poprvé prokázal schopnost transformace genetické informace u bakterie (viz kap. 2.1.1). Pouzdro bylo dříve považováno za jediný faktor virulence *S. pneumoniae*. Za jeho syntézu zodpovídají geny *cps* (*capsular polysaccharide*), z nichž tři, *cpsB*, *cpsC* a *cpsD*, jsou pro tvorbu pouzdra esenciální (Morona *et al.*, 2003). Jejich produkty jsou enzymové povahy: CpsB je Tyr proteinfosfatáza, CpsC je protein nezbytný pro aktivitu Tyr proteinkinázy CpsD. Na C-konci CpsD se nachází opakující se doména (YGX)<sub>4</sub>, jejíž Tyr zbytky jsou pro funkci tohoto enzymu esenciální.

Významným virulenčním faktorem je rovněž neuraminidáza, enzym vázaný na povrchu *S. pneumoniae* (Cámara *et al.*, 1994) projevující se exoglykozidázovou aktivitou. Neuraminidáza narušuje glykolipidy a glykoproteiny povrchu hostitelských buněk, a to tím, že z jejich koncových oligosacharidových řetězců odštěpuje kyselinu sialovou. Tímto způsobem dochází k narušení povrchu buněk, což podporuje možnost nalezení receptorů zprostředkujících interakci *S. pneumoniae* s buňkou a další šíření této bakterie. Nedaleko C-konce neuraminidázy (NanA) byl nalezen motiv LPXTG, který se vyskytuje také u jiných povrchových proteinů grampozitivních bakterií (Cámara *et al.*, 1994). Bylo zjištěno, že tento motiv na C-konci proteinu je rozpoznáván sortázou SrtA, transpeptidačním enzymem, jehož funkce spočívá v kovalentním připojení těchto povrchových proteinů k peptidoglykanu buněčné stěny. Inaktivace genu *srtA* vede k uvolňování NanA do kultivačního média (Kharat a Tomasz, 2003). V genomu *S. pneumoniae* se nacházejí nejméně dva geny (*nanA* a *nanB*) kódující neuraminidázy. Motiv LPXTG se však vyskytuje pouze u NanA (Bergmann a Hammerschmidt, 2006).

Pneumolyzin je toxin, který se vyskytuje v cytoplazmě *S. pneumoniae* a je uvolňován v závislosti na aktivitě enzymů autolyzinů způsobujících lyzi bakterie. Tento toxin váže cholesterol nacházející se v cytoplazmatické membráně buněk hostitele, kde vytváří oligomery v kruhové nebo obloukové orientaci, což vede ke vzniku pórů v plazmatické

membráně (Morgan *et al.*, 1994). Tím dojde k narušení osmotické rovnováhy a posléze k lyzi buňky. Pneumolysin se také podílí na zpomalení imunitní odpovědi inhibicí fagocytů a působí cytotoxicky na epitelální buňky, což způsobuje hemoragie. Nedávno bylo zjištěno, že pneumolysin je exprimován během počáteční fáze vytváření biofilmu, kdy se vyskytuje na povrchu buněk i v extracelulární matrix a zřejmě hraje při tomto procesu zatím blíže neurčenou roli (Shak *et al.*, 2013). Biofilm je pro *S. pneumoniae* důležitý během kolonizace nosohltanu (Domenech *et al.*, 2012) a v průběhu zánětu středního ucha (Hall-Stoodley *et al.*, 2006).

Virulenční faktory *S. pneumoniae* se však neomezují pouze na zmíněné tři. Dalším takovým faktorem je např. hyaluronátlyáza (Hyl), enzym na bakteriálním povrchu štěpící kyselinu hyaluronovou, což je složka extracelulární matrix tkání. Tato schopnost bakterii napomáhá v průniku tkáněmi a dalším šíření v hostiteli. Hyl se skládá z N-koncové domény vázající substrát a katalytické domény, mezi nimiž se nachází oddělující doména. Na C-konci se nalézá poslední doména, která reguluje přístup substrátu do katalytické domény (Rigden a Jedrzejewski, 2003)

Mezi virulenční faktory se řadí také povrchový protein PsaA (Pneumococcal surface antigen A). PsaA je kódován genem *psaA*, který je esenciální pro virulenci *S. pneumoniae* (Berry a Paton, 1996). Naskytá se tedy možnost, že by antigen PsaA mohl být potenciálně využitelný pro přípravu nového typu vakcíny. PsaA je součástí ABC transportního komplexu, jehož funkce spočívá v transportu manganatých iontů do buňky (Dintilhac *et al.*, 1997).

Virulenční význam má také několik cholin vazebných proteinů představujících hydrolázy buněčné stěny, mezi něž patří především hlavní autolysin LytA (*N*-acetylmuramoyl-L-alanin amidáza) a dále LytB (*N*-acetylglukozamidáza) a LytC (*N*-acetylmuramidáza) (Bergmann a Hammerschmidt, 2006). Autolysiny jsou enzymy katalyzující reakce uplatňující se při hydrolytickém rozkladu peptidoglykanu, což se děje buď během buněčného dělení, nebo pokud je buňka vystavena stresovým podmínkám a dochází k její lyzi.

Úloha autolysinu LytA spočívá v autolýze buněk stacionární fáze a též v lyzi indukované penicilinem. Během exponenciální fáze růstu kultury *S. pneumoniae* se nejvyšší hladina LytA vyskytuje v cytoplazmě a pouze menší množství tohoto enzymu je asociováno s buněčnou stěnou v extracelulárním prostoru. Bylo zjištěno, že spuštění lytického procesu závisí právě na překročení prahové hladiny LytA asociovaného s buněčnou stěnou (Mellroth *et al.*, 2012). LytB zastává nezbytnou úlohu při oddělování dceřiných buněk v závěrečné fázi

bunčného dělení. Mutace v genu *lytB* způsobuje vytváření dlouhých řetízků buněk (García *et al.*, 1999a).

LytC se od LytA i LytB strukturně liší a na základě biochemické analýzy jej lze označit za bakteriální lyzozym. Autolytickou aktivitu vykazuje při inkubaci bakteriální kultury v teplotě 30°C. LytC se jako primární produkt exprese genu *lytC* nachází v cytoplasmě, kdežto v aktivní formě se v cytoplazmatickém prostoru nevyskytuje a je vázán vně cytoplazmatické membrány (García *et al.*, 1999b). Deficience LytB nebo LytC má za následek výrazně sníženou schopnost kolonizace nosohltanu v krysím modelu (Gosink *et al.*, 2000).

### **2.1.3.2 Vakcíny**

Vakcíny proti *S. pneumoniae* jsou založeny na polysacharidech pouzdra, které představuje hlavní faktor virulence. Vysoká cena polysacharidových vakcín omezuje jejich dostupnost v rozvojových zemích, kde je však míra dětské mortality nejvyšší (Obr. 2.3). Mezi nejvíce užívané vakcíny patří 23 složková vakcína Pneumo 23 obsahující purifikované polysacharidové antigeny pouzdra z 23 sérotypů *S. pneumoniae*, které způsobují cca 90 % invazivních infekcí. Nevýhodou této vakcíny je skutečnost, že polysacharidy pouzdra nevyvolávají dostatečnou imunitní odpověď u novorozenců a malých dětí do dvou let věku kvůli jejich nedostatečně vyváženému imunitnímu systému (Bogaert *et al.*, 2004). V případě novorozenců a malých dětí je vhodné použít konjugované vakcíny jako je Prevenar, sedmisložková vakcína účinkující proti sedmi sérotypům způsobujícím pneumonie, meningitidy a sepse, Prevenar 13 nebo Synflorix. U konjugovaných vakcín obecně jsou polysacharidové antigeny připojeny na nosný protein a adsorbovány na minerálním nosiči.

## **2.2 Fosforylace u bakterií a přenos signálu**

Jednou z nejvýznamnějších kovalentních posttranslačních modifikací proteinů je fosforylace, při které dochází k reverzibilnímu přenosu  $\gamma$ -fosfátové skupiny z ATP na hydroxyskupinu aminokyseliny určitého substrátového proteinu za katalýzy enzymu proteinkinázy, přičemž odštěpením  $\gamma$ -fosfátu vznikne ADP. Opačným procesem je defosforylace katalyzovaná proteinfosfatázami, při které se substrátový protein uvede do původního stavu odštěpením fosfátu.

Fosforylace se uplatňuje ve všech třech doménách (*Bacteria*, *Archaea*, *Eukarya*) živých organismů a slouží k přenosu signálu v buňce, což je nezbytné k regulaci genové exprese. Díky tomu mohou organizmy reagovat na aktuální podmínky okolního prostředí. Aktivita či funkce cílových proteinů může být ovlivněna fosforylací, v některých případech naopak defosforylací, a to buď přímo navozením konformačních změn aktivního místa cílového substrátu (např. enzymu, u něhož modifikace způsobí změnu jeho aktivity), nebo nepřímo prostřednictvím regulace interakcí protein-DNA (např. pomocí transkripčního aktivátoru v pozici substrátu buď His kinázy TCS, nebo eSTK) či interakcí protein-protein (Pereira *et al.*, 2011).

Historie výzkumu fosforylace se začala psát počátkem 20. století poté, co Levene a Alsberg (1906) zjistili, že se v proteinu vitelinu pocházejícím z vaječného žloutku vyskytuje fosfát. Na tento výsledek navázali Lipmann a Levene (1932), když z tohoto proteinu izolovali fosfoaminokyselinu identifikovanou jako fosfoserin. Fosfothreonin se podařilo získat až o dvacet let později z kaseinu hovězího dobytka (de Verdier, 1952). Enzymaticky katalyzovanou fosforylační reakci zaznamenali jako vůbec první Burnett a Kennedy (1954). Jednalo se o reakci *in vitro* s použitím mitochondriálního extraktu z buněk krysích jater, radioaktivně značeného  $^{32}\text{P}$ -ATP ( $^{32}\text{P}$ -ATP vzniklo z ATP oxidativní fosforylací v mitochondriích po přidání anorganického ortofosfátu  $^{32}\text{P}$ ) a purifikovaného kaseinu, který posloužil jako jeden z testovaných cizorodých substrátů. Zjistilo se, že v mitochondriích je přítomen enzym schopný fosforylovat protein pomocí ATP $^{32}$ . Fosforylace přirozeného substrátu byla popsána již o rok později ve dvou studiích. Zmíněným substrátem byl enzym glykogenfosforyláza získaný z extraktu králičí svalové tkáně (Fischer a Krebs, 1955) a z jaterní tkáně (Sutherland a Wosilait, 1955).

Fosforylační aktivitu u bakterií se dlouho nedařilo prokázat. Byla potvrzena až ve dvou nezávislých studiích týkajících se organismů *Salmonella typhimurium* (Wang a Koshland, 1978) a *Escherichia coli* (Manai a Cozzone, 1979), přičemž u několika proteinů z obou bakterií bylo zjištěno, že jsou fosforylovány na serinových i threoninových zbytcích. Následující rok byl u prokaryot podrobněji popsán první proteinový substrát, u něhož byla zároveň známa příslušná kináza (Garnak a Reeves, 1979). Tento substrát představuje důležitý enzym Krebsova cyklu - izocitrát dehydrogenázu *E. coli*, regulovanou působením bifunkční kinázy/fosfatázy, kterou lze označit za neobvyklou kinázu stejně jako např. bifunkční HPr kinázu/fosfatázu, jejímž substrátem je protein HPr, jedna ze složek PEP-dependentního fosfotransferázového systému (viz kap. 2.2.1). Ačkoli fosfoproteomika učinila velký krok vpřed, zůstává zatím mnoho aspektů souvisejících s vlivem fosforylace na funkci

substrátových proteinů nejasných.

Zatímco u prokaryot většinou dochází k fosforylaci substrátového proteinu, kterým je určitý enzym účastníci se např. biosyntézy buněčné stěny, buněčného dělení nebo jiného buněčného procesu, u eukaryot přenos signálu od receptoru většinou probíhá složitější cestou, kde se uplatňují celé kaskády proteinkináz, přičemž signální dráhy jsou často i různým způsobem větvené a propojené.

U bakterií byla však také popsána některá propojení v signalizačním systému. Jako příklad lze uvést propojení mezi dvousložkovým systémem (TCS; viz kap. 2.2.2) a eSTK - tzv. cross talk, a to u bakterie *Myxococcus xanthus* (Sun a Shi, 2001; Nariya a Inouye, 2005), kde je exprese transkripčního aktivátoru MrpC, který se účastní kontroly vývojového cyklu, regulována oběma typy fosforylačních systémů. V neposlední řadě se propojení mezi těmito typy systémů vyskytuje u *Streptococcus agalactiae* (Rajagopal *et al.*, 2006) a také *S. pneumoniae* (Uliasz *et al.*, 2009), kde nespárovaný transkripční regulátor TCS s označením RitR zastává pozici substrátu eSTK (viz kap. 2.3.1). U eSTKs se také může vyskytovat substrátová promiskuita (jedna proteinkináza kontroluje více substrátů; Pereira *et al.*, 2011) a pravděpodobně i funkční redundance eSTKs (jeden substrát může být kontrolován více proteinkinázami; Pereira *et al.*, 2011), což může činit obtíže při identifikaci jejich specifických substrátů i vlastní charakterizaci těchto fosforylačních enzymů. Např. transkripční aktivátor genů sekundárního metabolismu AfsR u *Streptomyces coelicolor*, identifikovaný jako substrát eSTK AfsK *in vitro* (Matsumoto *et al.*, 1994), je fosforylován ještě dvěma dalšími eSTK PkaG a AfsL *in vitro* (Sawai *et al.*, 2004). U několika eSTKs *Mycobacterium tuberculosis* bylo nedávno zjištěno, že mohou fosforylovat shodný substrát *in vitro* (Grundner *et al.*, 2005).

U *S. pneumoniae* zajišťují přenos signálu dva hlavní typy fosforylačních systémů - dvousložkové systémy (TCSs) a bakteriální Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu (eSTKs). Pro doplnění přehledu bude pojednáno také o fosfoenolpyruvát-dependentním fosfotransferázovém systému, neboť tento fosforylační systém se podílí na regulaci některých fyziologických procesů a uplatňuje se i u grampozitivních bakterií.

### **2.2.1 Fosfoenolpyruvát-dependentní fosfotransferázový systém**

Fosfotransferázový systém (PTS) hraje zásadní roli při aktivním transportu i fosforylaci sacharidů, které jsou přenášeny do bakteriální buňky a také v regulaci některých metabolických drah a katabolické represi. Skládá se ze dvou nespecifických enzymů EI a HPr

(protein obsahující His zbytek), které se nacházejí v cytoplazmě a z několika podjednotek specifického enzymu EII asociovaného s cytoplazmatickou membránou. Enzymy tohoto systému společně vytvářejí fosforylační kaskádu, pro níž je zdrojem fosfátové skupiny fosfoenolpyruvát (PEP). Fosfátová skupina je kaskádou postupně přenesena až na substrát v podobě sacharidu, který je fosforylován a transportován enzymovým komplexem EII.

PTS byl objeven u gramnegativní bakterie *E. coli* (Kundig *et al.*, 1964) a bylo zjištěno, že může přenášet různé sacharidy včetně glukózy nebo *N*-acetylglukozaminu, ale vyskytuje se také u grampozitivních bakterií, např. u *Bacillus subtilis* (Reizer *et al.*, 1999).

Na základě genomové analýzy 26 sekvenovaných kmenů *S. pneumoniae* bylo odhaleno, že genom každého kmene obsahuje potenciální geny pro 15-21 PTSs (Bidossi *et al.*, 2012), konkrétně u kmene *S. pneumoniae* TIGR4 bylo tímto postupem odhaleno 21 potenciálních PTSs (Tettelin *et al.*, 2001), přičemž potenciální geny pro jeden PTS se nacházejí uvnitř oblasti kódující geny metabolismu fukózy, a jelikož je *N*-acetylfukozamin složkou pouzdra izolátu zmíněného kmene, mohlo by to naznačovat, že se tento PTS uplatňuje v transportu *N*-acetylfukozaminu nebo jiných derivátů fukózy do buňky.

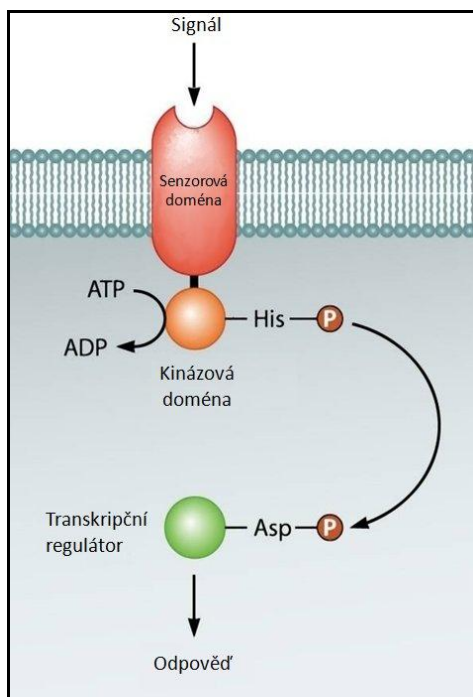
### 2.2.2 Dvousložkové systémy (TCSs)

Pojem dvousložkové systémy (TCSs) (někdy též označované jako *dvoukomponentové*) a jejich model zavedl Nixon *et al.* (1986). TCSs se skládají ze dvou složek: první z nich představuje transmembránová senzorová kináza a druhou cytoplazmatický transkripční regulátor (RR - z anglického názvu *response regulator*) (Obr. 2.4). Senzorová kináza registruje vnější signál a většinou sestává z extracytoplazmatické senzorové domény a histidinové kinázové domény, která se nachází v cytoplazmě. Jako donor fosfátové skupiny slouží ATP. Aktivace signální molekulou má za následek autofosforylaci kinázové domény na His zbytku a následnou fosforylaci Asp zbytku regulační domény příslušného RR (Obr. 2.4). RR většinou představuje transkripční aktivátor. Po fosforylaci transkripčního aktivátoru histidinovou kinázou dojde ke zvýšení jeho afinity k DNA, což posléze umožní jeho vazbu na regulační sekvenci DNA pomocí motivu helix-turn-helix v C-koncové vazebné doméně a následnou změnu genové exprese (Roggiani a Dubnau, 1993). Může docházet i k pozitivní zpětné vazbě, neboť RR často aktivuje i transkripci svého genu a genu kódujícího příslušnou histidinovou kinázu. Počet dvousložkových systémů kódovaných v genomu se může u různých bakterií značně lišit. Každý takový systém navíc ve většině případů registruje specifický signál jako je např. koncentrace signálních molekul (Pestova *et al.*, 1996),

pH (Perez *et al.*, 2007) nebo jiný faktor. U TCSs může docházet i k větvení signálních drah, kdy jedna histidinová kináza může fosforylovat více RRs nebo naopak jeden RR může být substrátem více kináz, případně může docházet k regulaci aktivity His kinázy nebo RR prostřednictvím pomocného proteinu (Buelow a Raivio, 2010). Dále bylo popsáno také propojení TCSs a eSTKs, zmíněné již v úvodu této kapitoly (viz kap. 2.2).

Přestože se v posledních desetiletích podařilo u bakterií identifikovat stovky dvousložkových systémů, které jsou zapojeny např. v kontrole rezistence k antibiotikům nebo virulenci, vyřazováním genů kódujících TCSs z funkce se ukázalo, že většina z nich není pro bakteriální buňku esenciální (Reinelt *et al.*, 2003). Ovšem u některých bylo naopak zjištěno, že jsou pro růst a životaschopnost bakterie esenciální (Fabret a Hoch, 1998; Martin *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 1999; Throup *et al.*, 2000).

Na základě bioinformatické analýzy bylo v genomu *S. pneumoniae* identifikováno 13 párů genů pro TCSs a jeden gen kódující nespárovaný RR s označením RitR, který je substrátem eSTK StkP *in vitro* (viz kap. 2.3.1.6). Pokusy s inaktivací genů pro složky těchto TCSs ukázaly, že v některých případech došlo k výraznému snížení virulence v plicích myšího hostitele (Throup *et al.*, 2000). Pouze u jediného TCS *S. pneumoniae*, byla prokázána esencialita pro životaschopnost této bakterie (Lange *et al.*, 1999; Throup *et al.*, 2000), avšak na základě mutačních a komplementačních pokusů se překvapivě ukázalo, že esenciální je pouze RR a inaktivace příslušné His kinázy růst bakterie neovlivnila (Throup *et al.*, 2000). Tento TCS *S. pneumoniae* lze najít pod názvem MicAB (MicB představuje His kinázu). Podle studie Kadioglu *et al.* (2003) má mutace MicB za následek snížení virulence při pneumonii, což je z neznámého důvodu v rozporu s dřívější studií týmu Throup *et al.*, (2000), kde jiný kmen s mutací MicB snížení virulence nevykazoval. Obě složky TCS MicAB vykazují homologii s TCS YycFG u bakterií *B. subtilis* (Fabret a Hoch, 1998) a *Staphylococcus aureus* (Martin *et al.*, 1999). TCSs *S. pneumoniae* se také účastní regulace kompetence. Jedná se o ComDE (Pestova *et al.*, 1996) a CiarH (Guenzi *et al.*, 1994) (viz kap. 2.1.2).



**Obr. 2.4:** Obecné schéma dvousložkového systému (TCS), který se skládá ze His kinázy obsahující dvě domény (červeně a oranžově) a transkripčního regulátoru (RR, zeleně). Po rozpoznání vnějšího signálu senzorovou doménou (červeně), která v rámci signalizace slouží jako vstupní doména His kinázy, dojde k autofosforylaci na His zbytku kinázové domény (oranžově) v cytoplasmě. Fosforylovaná kinázová doména, která slouží jako výstupní doména, katalyzuje fosforylaci na Asp zbytku regulační domény (na obrázku není rozlišena) RR představující substrát. Fosforylace regulační domény RR způsobí změnu konformace celého RR, která uvede výstupní doménu do aktivovaného stavu a umožní RR zprostředkovat určitou biologickou aktivitu. Přeloženo a převzato z (Bretl *et al.*, 2011).

Dvousložkové systémy byly pokládány za nejvýznamnější fosforylační systémy v bakteriální signalizaci. V poslední době se však ukazuje také význam bakteriálních Ser/Thr proteinkináz eukaryotického typu (eSTKs), jejichž substrátové proteiny se účastní mnoha klíčových procesů v bakteriálních buňkách.

### 2.2.3 Bakteriální Ser/Thr proteinkinázy eukaryotického typu (eSTKs)

Tento typ bakteriálních proteinkináz vykazuje strukturní i funkční podobnost svých katalytických domén se Ser/Thr proteinkinázami eukaryot, přičemž převážná většina proteinkináz v eukaryotických buňkách patří do jedné nadrodiny. Katalytická doména je složena z 250-300 aminokyselinových zbytků a představována 11 konzervovanými subdoménami (I-XI), které jsou od sebe oddělené méně konzervovanými oblastmi. Oblast s nejvyšší frekvencí konzervovaných zbytků utváří jádro katalytické domény, složené ze subdomén VI až IX (Hanks *et al.*, 1988).

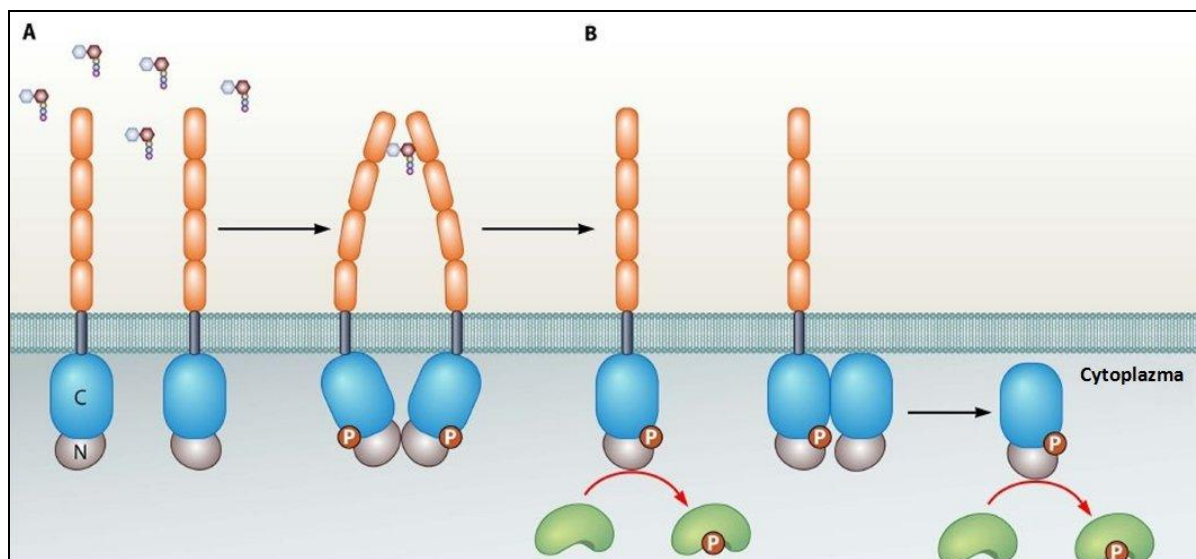
Dříve se mělo za to, že Ser/Thr proteinkinázy jsou záležitostí pouze domény *Eukarya*. V současnosti je však známo mnoho rozličných bakteriálních organizmů, u kterých jsou eSTKs i jejich příslušné proteinfosfatázy přítomny. Je však třeba poznamenat, že veškeré bakteriální Ser/Thr proteinkinázy do skupiny eSTKs nepatří. V doméně *Archaea* byly geny kódující potenciální eSTKs nalezeny rovněž (Smith a King, 1995).



Bakteriální eSTK se poprvé podařilo objevit u gramnegativní půdní bakterie *Myxococcus xanthus* (Muñoz-Dorado *et al.*, 1991). U tohoto mikroorganismu se složitým životním cyklem bylo na základě analýzy genomu zjištěno cca 100 genů kódujících potenciální eSTKs (Nariya a Inouye, 2003), avšak doposud byla bližší charakteristika provedena pouze u některých z nich (Pereira *et al.*, 2011). Rozsáhlá analýza mnoha genomů prokaryot poskytla údaje o přítomnosti potenciálních genů kódujících eSTKs téměř u dvou třetin osekvenovaných kmenů (Pérez *et al.*, 2008) a naznačila, že vyšší počet genů kódujících tyto enzymy má spojitost se složitým životním cyklem mikroorganismů a vytváření mnohobuněčných struktur jako jsou např. plodničky myxobakterií.

eSTKs mohou kromě katalytické domény obsahovat také různé přídavné domény, které plní funkci při protein-proteinových interakcích nebo zprostředkování vazby signální molekuly (např. PASTA doména (viz kap. 2.2.4), von Willebrandova A doména (VWA)). V případě bakterií toho o VWA doméně dosud příliš známo není, avšak u eukaryot se tato doména vyskytuje často jako součást některých extracelulárních proteinů. U eSTK PpkA gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* tvoří součást periplazmatického segmentu na C-konci, kde se patrně účastní procesu dimerizace po aktivaci neznámou signální molekulou (Mougous *et al.*, 2007), kterou se dosud nepodařilo identifikovat. Je třeba poznamenat, že v naprosté většině případů nebyla povaha vnějších signálních molekul aktivujících eSTKs zatím odhalena.

Obecně se eSTKs mohou vyskytovat buď ve formě cytoplazmatických enzymů, nebo jako transmembránové enzymy, jejichž extracelulární část se skládá z jediné či několika senzorových domén. Navázání signální molekuly na senzorovou doménu způsobí konformační změnu a následnou autofosforylaci intracelulární katalytické domény, která poté fosforyluje substrátový protein. Podle struktury eSTK PknB z *Mycobacterium tuberculosis* obsahující čtyři PASTA domény byl navržen model aktivace proteinkinázy signální molekulou, kde po navázání signální molekuly dojde k dimerizaci extracelulární domény skládající se z PASTA domén a následnému vytvoření dimeru katalytických domén v cytoplazmě (Barthe *et al.*, 2010). Výsledkem je aktivní forma proteinkinázy (Obr. 2.5), jež může fosforylovat příslušný substrátový protein, který je součástí signální dráhy.



**Obr. 2.5:** Modely aktivace eSTKs znázorněné na proteinkináze PknB *M. tuberculosis*:

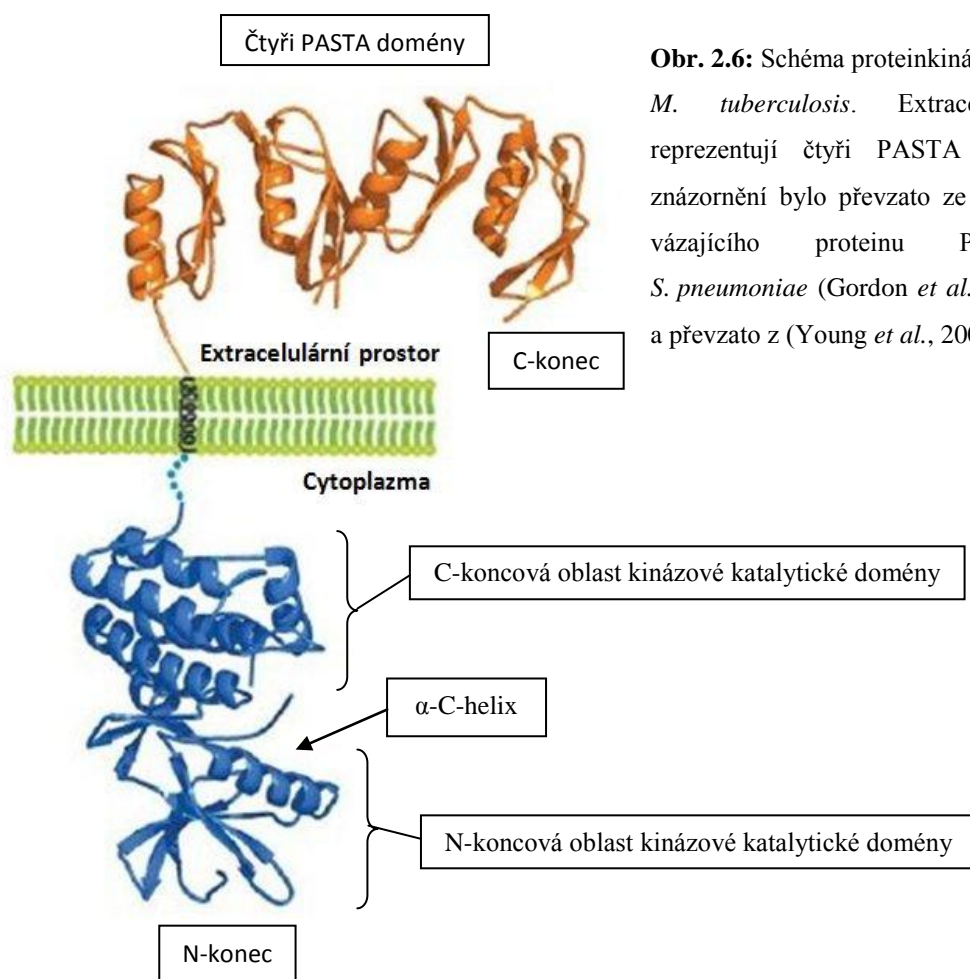
**A)** Pokud je přítomen ligand, který je navázán na extracelulární domény eSTK, může dojít prostřednictvím dvou monomerů PknB ke vzniku dimeru, což umožní přiblížení intracelulárních katalytických domén a vytvoření tzv. symetrického back-to-back dimeru s následnou aktivací proteinkináz jejich autofosforylací a přenesením fosfátové skupiny na příslušný substrátový protein.

**B)** Kináza aktivovaná autofosforylací je schopna buď přímé fosforylace substrátového proteinu, nebo může aktivovat solubilní proteinkinázu tak, že společně vytvoří tzv. asymetrický front-to-front dimer s následnou fosforylací substrátového proteinu.

Přeloženo a převzato z (Pereira *et al.*, 2011).

Zmíněná PknB představuje transmembránovou eSTK a skládá se z intracelulární kinázové domény a extracelulární části, které jsou spojeny  $\alpha$ -helixovým transmembránovým segmentem skládajícím se ze 70 aminokyselin. Extracelulární část se skládá ze čtyř PASTA domén (viz Obr. 2.6). Každou z těchto čtyř domén tvoří 66 aminokyselin se vzájemnou shodou dosahující 43 % (Young *et al.*, 2003). U zmíněné eSTK PknB byly uskutečněny dvě studie týkající se krystalové struktury aktivní formy tohoto enzymu tvořící binární komplex s analogy adenosintrifosfátu (ATP), které potvrdily celkovou podobnost katalytické domény PknB reprezentující eSTKs se svými eukaryotickými protějšky (Young *et al.*, 2003; Ortiz-Lombardía *et al.*, 2003). Katalytická doména sestává z N-koncové oblasti, obsahující dlouhý  $\alpha$ -C-helix a smyčku bohatou na glycín (Gly) důležitou pro vazbu nukleotidu, a C-koncové oblasti (Obr. 2.6), která je tvořena převážně  $\alpha$ -helixy. Relativní pozice  $\alpha$ -C-helixu představuje jednu z důležitých charakteristik, které určují konformační stav enzymu (Ortiz-Lombardía *et al.*, 2003).

Proteinkinázy zaujímají buď konformační stav uzavřený, nebo otevřený, což závisí na tom, v jaké relativní pozici se nacházejí N- a C-koncové oblasti katalytické domény vůči sobě. V uzavřené konformaci je enzym v aktivním stavu. Na základě dvou analýz krystalové struktury PknB reprezentující aktivní stav enzymu byla odhalena přítomnost dvou hořečnatých iontů sloužících jako kofaktor (Ortiz-Lombardía *et al.*, 2003) a dále bylo zjištěno, že katalytická doména s navázaným nukleotidem se nachází v uzavřené konformaci (Young *et al.*, 2003; Ortiz-Lombardía *et al.*, 2003), což se liší ve srovnání s eukaryotickou cAMP-dependentní proteinkinázou PKA, která v binárním komplexu enzym-nukleotid naopak zaujímala otevřenou konformaci a v uzavřené konformaci se nalézala jen v ternárním komplexu enzym-nukleotid-substrát (Zheng *et al.*, 1993). V případě binárního komplexu eukaryotické fosforylázy-kinázy PhK se došlo ke shodnému výsledku jako v případě eSTK PknB (Owen *et al.*, 1995).



**Obr. 2.6:** Schéma proteinkinázy PknB z bakterie *M. tuberculosis*. Extracelulární doménu reprezentují čtyři PASTA domény, jejichž znázornění bylo převzato ze struktury penicilin vázajícího proteinu PBP2x bakterie *S. pneumoniae* (Gordon *et al.*, 2000). Přeloženo a převzato z (Young *et al.*, 2003).

Poznatky, které poskytly studie eSTK PknB *M. tuberculosis*, svědčí o významné konzervovanosti struktury těchto proteinkináz mezi bakteriemi a eukaryoty (Ortiz-Lombardía *et al.*, 2003). Obdobná struktura i vlastnosti PknB v porovnání se svými protějšky z živočišných buněk posilují tezi o univerzálním aktivačním mechanismu Ser/Thr proteinkináz (Young *et al.*, 2003).

Substráty fosforylované eSTKs zastávají důležité funkce v rozmanitých buněčných procesech jako je biosyntéza buněčné stěny, buněčné dělení, vývojový cyklus a diferenciace, primární a sekundární metabolismus nebo hrají roli ve virulenci u některých patogenních mikroorganismů jako je např. *Streptococcus agalactiae* (Rajagopal *et al.*, 2003). Pozoruhodným příkladem substrátu, který není součástí bakteriální buňky, je aktin makrofágů hostitele v případě eSTK YpkA (YopO) u některých patogenních bakterií rodu *Yersinia* (Juris *et al.*, 2000). Již před identifikováním tohoto exogenního substrátu bylo objeveno, že YpkA je pro virulenci patogenní bakterie *Y. pseudotuberculosis* esenciální (Galyov *et al.*, 1993). Ke ztrátě virulence postačuje absence C-koncové oblasti YpkA nebo jen 20 posledních aminokyselin na C-konci enzymu (Juris *et al.*, 2000).

Značnou část z předpokládaných proteinkináz však tvoří hypotetické proteiny identifikované analýzou sekvenovaných genomů. Mnoho potenciálních substrátů eSTKs zatím nebylo potvrzeno *in vivo*, nýbrž pouze v podmínkách *in vitro*, což přináší riziko možného výskytu arteficiálních sekundárních fosforylačních míst.

#### **2.2.4 PASTA doména**

PASTA doména (Penicillin-binding protein And Serine/Threonine kinase Associated domain) se vyskytuje u eSTKs a vysokomolekulárních penicilin vázajících proteinů (PBPs). Repetice PASTA domény se vždy skládá z přibližně 70 aminokyselinových zbytků. Jelikož se konzervovaná oblast vyskytuje buď v několika kopiích, nebo i samostatně, je to spíše doména než strukturní repetice, což podpořila i krystalografická analýza vysokomolekulárního PBP s označením PBP2x z bakterie *S. pneumoniae*. PBP2x je jedním z enzymů účastnících se biosyntézy buněčné stěny. Prvky, které vytvářejí globulární strukturu PASTA domény, čítají jeden  $\alpha$ -helix a tři  $\beta$ -listy. Mezi prvním a druhým  $\beta$ -listem se nachází smyčka variabilní délky (Yeats *et al.*, 2002).

U eSTKs představuje extracelulární přídavnou doménu, která se nachází na C-konci těchto enzymů u některých grampozitivních bakterií, z nichž se jedná především o kmeny *Actinobacteria* a také *Firmicutes*, kde se většinou nachází v podobě vícečetné domény (Jones

a Dyson, 2006). PASTA doména byla také odhalena jako součást některých hypotetických proteinů a peptidyl-prolyl izomerázy archebakterií (Yeats *et al.*, 2002). Její přítomnost se tedy neomezuje pouze na bakterie, ale u eukaryot doposud objevena nebyla. V případě PBPs se vyskytuje rovněž na C-konci a předpokládá se u ní schopnost vazby  $\beta$ -laktamových antibiotik a jejich peptidoglykanových analogů.

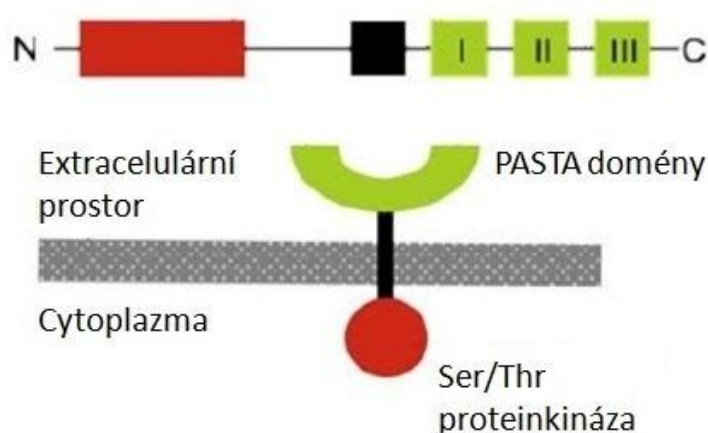
Trojrozměrná krystalová struktura PBP2x *S. pneumoniae* byla poprvé vytvořena výzkumným týmem Pares *et al.* (1996). PBP2x se skládá ze tří domén - uprostřed nich a tedy zároveň vedle PASTA domény, se nachází transpeptidázová doména (Dessen *et al.*, 2001). Nedávná studie přinesla zjištění, že PBP2x ovlivňuje morfologii *S. pneumoniae*, je esenciální pro buněčné dělení a jeho lokalizace v septu závisí na přítomnosti PASTA domén nacházejících se na C-konci tohoto proteinu, avšak nikoli na přítomnosti transpeptidázové domény (Peters *et al.*, 2014). Transpeptidázová doména je schopna vázat dvě molekuly antibiotika cefuroximu (cefalosporin druhé generace). Bylo zjištěno, že se první molekula antibiotika kovalentně váže na Ser zbytek transpeptidázové domény a druhá na PASTA doménu pomocí van der Waalsových vazeb. Na obou místech dochází k vazbě cefuroximu prostřednictvím  $\beta$ -laktamového kruhu, který je strukturním analogem volné molekuly peptidoglykanu, přesněji C-koncového acylu D-alanyl-D-alaninu peptidového řetězce peptidoglykanu, který je přirozeným transpeptidačním substrátem některých PBPs. To naznačuje, že PASTA doména má schopnost vázat volné molekuly peptidoglykanu. Zřejmě však nedochází k těsnému spojení z důvodu blokování transpeptidázové domény, která rozeznává a atakuje předposlední D-Ala peptidového řetězce peptidoglykanu (Yeats *et al.*, 2002). Na základě získaných poznatků byla vyslovena domněnka, že peptidoglykan pravděpodobně slouží jako signální molekula vázající se na extracelulární PASTA domény eSTKs (Shah *et al.*, 2008). V nedávné době se podařilo prokázat, že PASTA domény StkP *S. pneumoniae* mají skutečně schopnost vázat volné podjednotky peptidoglykanu připravené syntetickou cestou (Maestro *et al.*, 2011).

Předpokládá se, že PASTA domény hrají roli v regulaci aktivity eSTKs i PBPs, které jsou důležité pro biosyntézu buněčné stěny (Gordon *et al.*, 2000; Yeats *et al.*, 2002), což patrně souvisí s tím, že geny kódující eSTKs s PASTA doménami většinou leží nedaleko genů pro enzymy souvisejícími se signalizací a právě biosyntézou buněčné stěny.

V současné době se rozšiřující multirezistence bakterií k antibiotikům stává čím dál závažnější záležitostí. Určitou alternativu k dnešním antibiotikům by mohly přinést specifické inhibitory, které by dokázaly zablokovat činnost eSTKs, jejichž substrátové proteiny se účastní zásadních buněčných procesů jako je buněčné dělení nebo biosyntézu buněčné stěny.

A možným cílem pro tyto inhibitory by se mohly stát právě přídavné PASTA domény eSTKs grampozitivních bakterií. Zatím nebylo zjištěno, že by se tyto domény vyskytovaly u eukaryot. Další výhodou by bylo jejich umístění v extracelulárním prostoru.

PASTA domény byly kromě proteinkinázy StkP *S. pneumoniae* (Nováková *et al.*, 2010; pojednáno dále v samostatné kap. 2.3) objeveny také u dalších eSTKs grampozitivních bakterií jako je *Bacillus subtilis*, u něhož byla popsána jediná eSTK PrkC (Obr. 2.7). Jedná se o transmembránovou proteinkinázu obsahující N-koncovou cytoplazmatickou kinázovou doménu a velkou C-koncovou extracelulární doménu (Madec *et al.*, 2002) se třemi repetitivními motivy PASTA (Shah *et al.*, 2008). Bylo zjištěno, že substrátem PrkC a zároveň příslušné proteinfosfatázy PrpC *in vitro* je elongační faktor EF-G (Gaidenko *et al.*, 2002), jenž byl posléze potvrzen také jako substrát PrkC *in vivo*. K fosforylaci EF-G dochází v rostoucích buňkách v přítomnosti fragmentů peptidoglykanu (Shah a Dworkin, 2010), což vede k hypotéze, že tyto fragmenty s velkou pravděpodobností interagují s extracelulárními PASTA doménami PrkC a mohly by sloužit jako signální molekuly. Tuto hypotézu může podpořit pozorování, že přítomnost peptidoglykanových fragmentů má za následek klíčení dormantních spor *B. subtilis* (Shah *et al.*, 2008).



**Obr. 2.7:** Schéma proteinkinázy PrkC *B. subtilis*, která se skládá z cytoplazmatické proteinkinázové domény (červeně) na N-konci enzymu, transmembránové části (černě) a C-koncové extracelulární domény obsahující tři PASTA domény (zeleně). Přeloženo a převzato z (Shah *et al.*, 2008).

Přítomnost funkční eSTK PrkC *B. subtilis* je nezbytná pro expresi genu *yocH* kódujícího peptidoglykanovou hydrolázu YocH, která je z cytoplazmy sekretována do okolí buňky. Jelikož inkubace rostoucích buněk v médiu s peptidoglykanovými fragmenty má za následek indukci exprese genu *yocH*, nabízí se možnost, že by hydroláza YocH mohla sloužit

bakterii ke štěpení peptidoglykanu uvolněného z okolních bakterií na fragmenty, které by mohly být rozpoznány PASTA doménami PrkC, jejíž aktivita by poté indukovala expresi *yocH*. YocH by tímto způsobem podporovala svou vlastní expresi (Shah a Dworkin, 2010).

Na základě sekvenční analýzy *Streptococcus pyogenes* bylo odhaleno, že v genomu je přítomen jeden gen pro potenciální eSTK SP-STK a jeden gen pro potenciální eSTP SP-STP (Jin a Pancholi, 2006). Na C-konci SP-STK se nacházejí tři extracelulární PASTA domény, jejichž délka se pohybuje v rozmezí 68-81 aminokyselinových zbytků.

V genomu *Streptococcus mutans*, bakterie způsobující zubní kazy, byl nalezen jeden gen (*pknB*) kódující eSTK PknB obsahující tři PASTA domény na C-konci enzymu a gen *pppL* pro eSTP. Mutace genu *pknB* má za následek snížení kompetence, tvorby biofilmu i sníženou odolnost vůči nízkému pH, což jsou důležité faktory pro patogenezi *S. mutans* (Hussain *et al.*, 2006).

PASTA domény byly nalezeny také u eSTK PrkC střevní bakterie *Enterococcus faecalis*. PrkC je transmembránová proteinkináza obsahující pět extracelulárních repetitivních PASTA domén a hraje roli v rezistenci k antibiotikům, perzistenci v gastrointestinálním traktu a také zřejmě registruje narušení celistvosti buněčné stěny a zprostředkovává adaptivní odpověď (Kristich *et al.*, 2007).

Dalším příkladem je půdní tyčinkovitá bakterie *Corynebacterium glutamicum*, známá především jako průmyslový producent kyseliny L-glutamové a L-lysinu. U této bakterie byly nalezeny čtyři eSTKs: PknA, PknB, PknL a PknG. První tři obsahují jeden transmembránový helix a jsou patrně umístěny v membráně. U PknB byly na C-konci tohoto enzymu identifikovány čtyři a u PknL pět PASTA domén (Schultz *et al.*, 2009). PknG představuje solubilní enzym a je jedním ze substrátů PknA potvrzených *in vitro* (Fiuza *et al.*, 2008). Pro životaschopnost *C. glutamicum* není žádná ze čtyř uvedených eSTKs esenciální, k čemuž se dospělo na základě delecí genů kódujících tyto proteinkinázy (Schultz *et al.*, 2009).

Zdaleka nejvyšší počet eSTKs byl identifikován a charakterizován u bakterie *Mycobacterium tuberculosis*. Analýza sekvence genomu odhalila 11 potenciálních eSTKs: PknA, B, D, E, F, G, H, I, J, K, L (Av-Gay a Everett, 2000), z nichž nejpodrobněji byla popsána a charakterizována PknB (Av-Gay *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2003; Ortiz-Lombardía *et al.*, 2003; Barthe *et al.*, 2010; viz kap. 2.2.3) obsahující čtyři kopie PASTA domény. PknG a PknK jsou solubilní proteinkinázy, u ostatních identifikovaných eSTKs lze vzhledem k jejich předpokládanému transmembránovému umístění očekávat, že by mohly registrovat signály z vnějšího prostředí a přenášet informaci do buňky (Cole *et al.*, 1998). Jedním ze substrátů PknB je vysokomolekulární protein PBPA, patřící do PBPs, který hraje roli v

biosyntéze peptidoglykanu v septu při buněčném dělení (Dasgupta *et al.*, 2006). Je třeba zmínit i GlmU, enzym biosyntézy buněčné stěny, který byl potvrzen jako společný substrát PknA a PknB *in vitro* (Parikh *et al.*, 2009).

Genom *Staphylococcus aureus* obsahuje jeden gen kódující eSTK PknB/Stk, jejíž součástí jsou tři PASTA domény, a jeden gen kódující eSTP Stp (Beltamini *et al.*, 2009; Ohlsen a Donat, 2010). Tyto enzymy jsou důležité pro metabolismus buněčné stěny, buněčné dělení a ovlivňují citlivost k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům. Na základě experimentů s použitím mutantních kmenů *S. aureus* v genech PknB/Stk a Stp bylo zjištěno, že tyto kmeny mají defekty buněčného dělení a vykazují nepravidelnou morfolonii buněk (Beltamini *et al.*, 2009). Je zajímavé, že PknB/Stk představuje sekretovaný protein vzhledem k tomu, že byla predikována jako transmembránový protein, a tak je možné předpokládat, že by PknB/Stk mohla fosforylovat některé proteiny hostitele např. poté, co bude bakterie fagocytována makrofágem hostitele (Miller *et al.*, 2010).

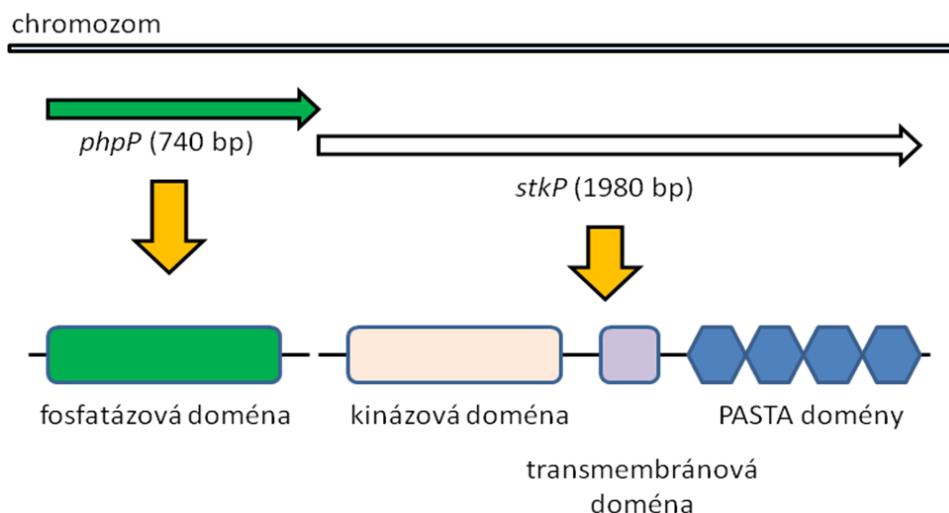
### 2.3 Proteinkináza StkP *S. pneumoniae*

Proteinkináza StkP se na základě své struktury a aktivity řadí mezi eSTKs a je homologem eSTK PknB *M. tuberculosis* (Av-Gay *et al.*, 1999; Nováková *et al.*, 2010). Analýzou genomu *S. pneumoniae* byla zjištěna přítomnost jediného genu kódujícího eSTK StkP, který je součástí stejného operonu jako gen kódující solubilní proteinfosfatázu eSTP PhpP typu PP2C (Obr. 2.8), a jak již bylo uvedeno v úvodu této práce, tento důležitý poznatek předurčuje *S. pneumoniae* jako ideální mikroorganismus pro výzkumy v oblasti eSTKs a jejich substrátů. Navíc se ukázalo, že tyto dva enzymy zřejmě tvoří pár, který se funkčně doplňuje (Nováková *et al.*, 2005; Osaki *et al.*, 2009). Na základě sekvenční analýzy byl rovněž odhalen čtyřnukleotidový překryv genů *stkP* a *phpP*, což naznačuje, že by u těchto genů mohla probíhat společná regulace na transkripční úrovni (Nováková *et al.*, 2005).

Jedná se o transmembránovou proteinkinázu, v jejíž C-koncové extracelulární oblasti se nacházejí čtyři kopie PASTA domény, které jsou nezbytné pro aktivaci a fosforylační funkci StkP *in vivo* (Nováková *et al.*, 2010). Byl podán důkaz, že se StkP vyskytuje *in vivo* v podobě dimeru a bylo prokázáno, že tato proteinkináza má schopnost vytvářet homodimery prostřednictvím své transmembránové domény a extracelulární oblasti obsahující čtyři kopie PASTA domény. Potvrzení výskytu StkP ve formě homodimeru bylo úspěšně provedeno pomocí nativní elektroforézy. Dimerizace je tedy nezbytným předpokladem pro funkční



formu enzymu. StkP bez transmembránové domény není z důvodu neschopnosti vytvořit dimer s jiným monomermem funkční a podstupuje degradaci (Pallová *et al.*, 2007a).



**Obr. 2.8:** Schéma znázorňující geny *phpP* a *stkP* *S. pneumoniae* a produkty jejich exprese: solubilní proteinfosfatázu PhpP tvořenou fosfatázovou doménou a transmembránovou proteinkinázou StkP skládající se z kinázové domény, transmembránové domény a čtyř extracelulárních PASTA domén.

Ukázalo se, že StkP není pro životaschopnost *S. pneumoniae* esenciální, alespoň tedy v laboratorních podmínkách. Avšak inaktivace genu *stkP* u virulentních kmenů způsobuje výrazné snížení virulence v myším modelu infekce a v nevirulentních kmenech má za následek snížení přirozené kompetence a vede též k předčasné lyzi buněk. Bylo zjištěno, že StkP je zapojená v signální dráze regulující navození kompetence a její aktivita je nezbytná pro expresi operonu kompetence, ve kterém leží geny *comCDE* (Echenique *et al.*, 2004). StkP také pozitivním způsobem ovlivňuje transkripci řady genů, které se účastní různých buněčných procesů jako je biosyntéza buněčné stěny, biosyntéza pyrimidinu, příjem železa, opravy DNA a odpověď na oxidativní stres. Deleční kmen  $\Delta$ *stkP* je dále citlivý k rozličným stresovým podmínkám jako je zvýšená teplota, působení oxidačních činidel, nízké pH či osmotický tlak (Sasková *et al.*, 2007). Role StkP je tedy důležitá pro regulaci odpovědi *S. pneumoniae* na vnější stresové podmínky, avšak tato proteinkináza se účastní také klíčových buněčných procesů (viz kap. 2.3.1). jako je např. biosyntéza buněčné stěny nebo buněčné dělení. Pozorování kmene  $\Delta$ *stkP* elektronovým mikroskopem ukázalo, že dochází k atypickému prodloužení tvaru buněk s defektem buněčného dělení (Giefing *et al.*, 2008).

Pomocí imunofluorescenční mikroskopie bylo objeveno, že StkP kolokalizuje ve středu buňky spolu s aparátem buněčného dělení, avšak zřejmě až po vytvoření prstence FtsZ, neboť kmen  $\Delta stkP$  narušení při vytváření prstence FtsZ nevykazuje (Giefing *et al.*, 2010). Na základě časosběrné (time-lapse) fluorescenční mikroskopie bylo prokázáno, že se StkP připojuje k dělicímu aparátu po proteinu FtsA, ale před připojením proteinu DivIVA, který je substrátem proteinkinázy StkP stejně jako proteiny buněčného dělení FtsA i FtsZ (viz kap 2.3.1). Dále bylo zjištěno, že StkP kolokalizuje s její příslušnou proteinfosfatázou PhpP v místech, kde probíhá aktivní syntéza buněčné stěny a že lokalizace i aktivita StkP závisí na přítomnosti PASTA domén jako strukturní součásti tohoto enzymu. Pokud jsou buňky *S. pneumoniae* vystaveny působení antibiotik, která narušují biosyntézu buněčné stěny (např. vankomycinu), dochází k delokalizaci StkP i PhpP, což může být vysvětleno tím, že pokud podjednotky peptidoglykanu slouží jako ligandy pro PASTA domény StkP, vankomycin omezí dostupnost těchto podjednotek vazbou na C-koncový zbytek D-Ala-D-Ala peptidového řetězce peptidoglykanu a naruší tak aktivitu StkP. To by mohlo podpořit i zjištění, že PhpP lokalizuje v septu pouze v případech, že je StkP aktivní (Beilharz *et al.*, 2012).

Vzhledem k tomu, že StkP *S. pneumoniae* představuje mimořádně konzervovaný protein napříč všemi klinickými izoláty a zároveň velmi imunogenní antigen, byla vybrána jako potenciálně efektivní složka pro vývoj nové vakcíny (Giefing *et al.*, 2008).

### 2.3.1 Přehled substrátů proteinkinázy StkP *S. pneumoniae*

Do této doby se podařilo identifikovat devět substrátů proteinkinázy StkP, a to buď v podmínkách *in vitro*, nebo *in vivo*, anebo byly potvrzeny v obou typech podmínek (Tab. 2.1). Tyto substráty zahrnují čtyři proteiny buněčného dělení: **DivIVA**, **Spr0334** (Nováková *et al.*, 2010), **FtsZ** (Giefing *et al.*, 2010), **FtsA** (Beilharz *et al.*, 2012), anorganickou pyrofosfatázu **PpaC** (Nováková *et al.*, 2010), dva transkripční regulátory: **RitR** (Ulijasz *et al.*, 2009), **RR06** (Agarwal *et al.*, 2012), dva enzymy účastníci se biosyntézy buněčné stěny: **MurC** (Falk a Weisblum, 2013) a především **GlmM** (Nováková *et al.*, 2005), fosfoglukozaminmutázu, která je předmětem výzkumu v této práci (viz kapitola 5 Výsledky).

Substrát StkP	Podmínky potvrzení		Zdroj
DivIVA	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	Nováková <i>et al.</i> , 2010
FtsZ	-	<i>in vitro</i>	Giefing <i>et al.</i> , 2010
FtsA	-	<i>in vitro</i>	Beilharz <i>et al.</i> , 2012
Spr0334	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	Nováková <i>et al.</i> , 2010
PpaC	<i>in vivo</i>	-	Nováková <i>et al.</i> , 2010
RitR	-	<i>in vitro</i>	Ulijasz <i>et al.</i> , 2009
RR06	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	Agarwal <i>et al.</i> , 2012
MurC	-	<i>in vitro</i>	Falk a Weisblum, 2013
GlmM	-	<i>in vitro</i>	Nováková <i>et al.</i> , 2005

**Tab. 2.1:** Souhrn jednotlivých substrátů eSTK StkP *S. pneumoniae* včetně podmínek, ve kterých byly jako substráty StkP potvrzeny.

### 2.3.1.1 DivIVA

DivIVA byl jako substrát proteinkinázy StkP *in vivo* odhalen na základě analýzy fosfoproteomu a s použitím hmotnostní spektrometrie. Fosforylace DivIVA zmíněnou proteinkinázou byla potvrzena kinázovou reakcí také v podmínkách *in vitro* (Nováková *et al.*, 2010). V tyčinkovité bakterii *B. subtilis* se DivIVA společně s proteiny MinC a MinD podílí na určení středu buňky při buněčném dělení. Po rozdělení buňky je role DivIVA důležitá v udržování těchto proteinů u buněčných pólů (Marston a Errington, 1999). Protein buněčného dělení DivIVA je konzervovaný u grampozitivních bakterií. Pomocí imunofluorescenční a imunoelektronové mikroskopie bylo zjištěno, že v *S. pneumoniae* hraje roli v morfologii buněk, vytváření septa, oddělování dceřiných buněk od sebe a segregaci chromozomů (Fadda *et al.*, 2007; Nováková *et al.*, 2010).

### 2.3.1.2 FtsZ

Substrátem StkP je také esenciální protein buněčného dělení FtsZ, homolog tubulinu eukaryotických buněk, který při buněčném dělení polymeruje za vzniku prstence, což se děje ve středu buňky, kde posléze dochází k tvorbě septa. FtsZ byl odhalen jako substrát StkP *in vitro*, avšak fosforylace proteinkinázou StkP není pro vznik prstence FtsZ esenciální, neboť kmen  $\Delta stkP$  defekty při jeho vzniku nevykazuje. Navíc se nepodařilo u kmene  $\Delta stkP$  objevit

žádné změny ve fosforylaci FtsZ ve srovnání s kmenem divokého typu (Giefing *et al.*, 2010). FtsZ specificky váže a hydrolyzuje GTP (de Boer *et al.*, 1992) a je kódován genem *ftsZ*, u něhož byla potvrzena esencialita pro životaschopnost *E. coli* (Dai a Lutkenhaus, 1991).

#### **2.3.1.3 FtsA**

Jako substrát eSTK StkP byl odhalen i další protein buněčného dělení - FtsA, který je touto proteinkinázou fosforylován *in vitro* (Beilharz *et al.*, 2012). FtsA, bakteriální homolog aktinu eukaryotických buněk, je kódován genem *ftsA*, který je esenciální pro životaschopnost *S. pneumoniae* (Lara *et al.*, 2005). Tento protein je schopen vázat některé nukleotidy včetně ATP a během exponenciální fáze růstu *S. pneumoniae* lokalizuje ve vznikajícím septu uprostřed dělicí se buňky. Byla popsána také schopnost vytvářet polymery *in vitro* a interakce mezi proteiny FtsA navzájem i s proteinem FtsZ (Lara *et al.*, 2005).

#### **2.3.1.4 Spr0334**

Hypotetický membránový protein Spr0334 je fosforylován proteinkinázou StkP *in vivo*, což bylo potvrzeno také *in vitro* (Nováková *et al.*, 2010). Jediný dosud známý homolog tohoto proteinu je hypotetický protein neznámé funkce SAK\_0375, substrát eSTK Stk1 *Streptococcus agalactiae* (Silvestroni *et al.*, 2009). Podstata funkce Spr0334 není zatím známa, avšak nejnovější poznatky naznačují, že se jedná o protein buněčného dělení u *S. pneumoniae*, který hraje zatím blíže neurčenou roli ve výběru místa dělení nebo segregace chromozomů. Také bylo zjištěno, že se nachází především v septu a jeho lokalizace není stavem fosforylace významněji ovlivněna (Štekerová, 2012).

#### **2.3.1.5 PpaC**

Dalším substrátem StkP je Mn-dependentní anorganická pyrofosfatáza PpaC. Anorganické pyrofosfatázy jsou enzymy katalyzující hydrolýzu anorganických pyrofosfátů na ortofosfáty. Ukázalo se, že hraje roli ve virulenci bakterie *Streptococcus agalactiae* (Rajagopal *et al.*, 2003). Ke vzniku pyrofosfátů, které mohou ovlivňovat aktivitu enzymů, dochází při hydrolýze ATP nebo v průběhu různých biosyntetických reakcí, které jsou součástí některých metabolických drah. Bylo zjištěno, že PpaC je fosforylována proteinkinázou StkP *in vivo*. V podmínkách *in vitro* se to však nepotvrdilo, což může

naznačovat, že je zapotřebí spolupůsobení dalšího enzymu jako interakčního partnera, případně jiné podmínky reakce (Nováková *et al.*, 2010).

#### **2.3.1.6 *RitR***

Protein RitR (Repressor of iron transport - represor transportu železa; Uliasz *et al.*, 2004) byl na základě bioinformatické analýzy genomové sekvence *S. pneumoniae* identifikován jako nespárovaný transkripční regulátor TCS, který však postrádá příslušnou His kinázu. Žádná sekvence pro potenciální His kinázu nebyla v okolí sekvence kódující RitR nalezena (Throup *et al.*, 2000). RitR reprimuje příjem železa *in vitro* (Uliasz *et al.*, 2004). Inaktivace genu kódujícího RitR u *S. pneumoniae* způsobí snížení virulence (Throup *et al.*, 2000), ale také značné zvýšení exprese genů pro příjem komplexu Fe-hem (Uliasz *et al.*, 2004). RitR se skládá z C-koncové DNA vazebné domény a N-koncové regulační domény, kde byl v predikované pozici pro fosforylaci His kinázou TCS nalezen asparagin (Asn) namísto očekávaného aspartátu (Asp). Bylo potvrzeno, že RitR je substrátem StkP *in vitro*, neboť tato eSTK jej fosforyluje v DNA vazebné doméně. Opačně působí eSTP PhpP. Fosforylovaný RitR následně interaguje s promotorem *piu*, pod jehož kontrolou jsou geny operonu *piuBCDA* kódujícího proteiny pro příjem železa, a dochází k potlačení exprese operonu (Uliasz *et al.*, 2009). Tato zjištění ukazují na dosud nepopsaný způsob regulace genové exprese u *S. pneumoniae*.

#### **2.3.1.7 *RR06***

RR06 představuje příslušný regulátor odpovědi His kinázy HK06 v rámci TCS06, jednoho ze 13 identifikovaných TCSs *S. pneumoniae* (Throup *et al.*, 2000; Standish *et al.*, 2005). Bylo zjištěno, že RR06 slouží jako transkripční aktivátor genu *cbpA* kódujícího CbpA, jeden z cholin vazebných proteinů *S. pneumoniae*, který slouží jako povrchový adhezín, je známý též pod označením PspC a představuje jeden z mnoha virulenčních faktorů této bakterie (Standish *et al.*, 2005). Ukázalo se, že hraje roli také v regulaci exprese genu *pspA* kódujícího další cholin vazebný protein podílející se na virulenci u *S. pneumoniae* (Standish *et al.*, 2007). Bylo zjištěno, že RR06 je fosforylován proteinkinázou StkP na Thr zbytcích v podmínkách *in vitro* a *in vivo* nezávisle na HK06. Takto posttranslačně modifikovaný RR06 vykazuje vysokou účinnost vazby na promotor genu *cbpA*. Opačný účinek má na RR06

defosforylační aktivita eSTP PhpP. Tyto poznatky nasvědčují tomu, že exprese genu *cbpA* je pod přímou regulací páru StkP-PhpP (Agarwal *et al.*, 2012).

#### **2.3.1.8 *MurC***

Ligáza MurC, enzym nezbytný pro biosyntézu buněčné stěny, se účastní syntézy meziprojektu nutného pro syntézu peptidoglykanu. Katalyzuje reakci, při níž se na UDP-*N*-acetylmuramovou kyselinu (UDP-MurNAc), nukleotidový prekurzor peptidoglykanu, naváže první aminokyselinový zbytek (L-alanin). Ukázalo se, že fosforylace MurC je závislá na proteinkináze StkP *in vitro* (Falk a Weisblum, 2013).

#### **2.3.1.9 *GlmM***

Poněvadž se tato práce týká analýzy esenciality genu *glmM*, který kóduje GlmM *S. pneumoniae*, je o tomto enzymu obecně pojednáno v samostatné kapitole (viz kap 2.4) a konkrétně o GlmM *S. pneumoniae* (viz kap. 2.4.2.9).

### **2.4 Fosfoglukozaminmutáza (*GlmM*)**

Fosfoglukozaminmutáza, nejčastěji označována jako GlmM, případně PNGM nebo i jinak, představuje enzym biosyntézy buněčné stěny, který je součástí proteinové rodiny  $\alpha$ -D-fosfohexomutáz (Shackelford *et al.*, 2004; [www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR005841](http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR005841)), které sdílejí obecný reakční mechanismus (Obr. 2.10), přítomnost vysoce konzervovaného serinového zbytku, na kterém jsou fosforylovány, i požadavek na vazbu hořčnatého iontu jako kofaktoru pro jejich plnou katalytickou aktivitu. Odlišují se však svou specifitou pro substrát.

GlmM hraje nepostradatelnou roli v biosyntetické dráze vedoucí k UDP-*N*-acetylglukozaminu, nezbytnému prekurzoru složek bakteriální buněčné stěny (především peptidoglykanu, ale také teichoových kyselin, nebo lipopolysacharidů), kde katalyzuje přeměnu glukozamin-6-fosfátu na glukozamin-1-fosfát (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996). Na základě mezinárodního názvosloví, které enzymy třídí podle typu katalyzované chemické reakce, patří GlmM (EC 5.4.2.10; [www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme](http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme)) mezi izomerázy, přesněji do podtřídy fosfotransferáz (fosfomutáz), neboť katalyzuje přenos fosfátových skupin.

Přestože se jedná o důležitý enzym v biosyntéze buněčné stěny, byl dosud charakterizován pouze u omezeného počtu bakteriálních organismů. Krystalografická analýza a studie provedená pomocí metody dynamického rozptylu světla nasvědčují tomu, že se GlmM vyskytuje ve formě dimeru (Mehra-Chaudhary *et al.*, 2011). Kromě bakterií uvedených dále (viz kap. 2.4.2) se na základě analýzy sekvenční identity podařilo nalézt geny podobné *glmM* také u bakterií *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium leprae*, *Clostridium perfringens*, sinice *Synechocystis* a dokonce u organismu z domény *Archaea* s názvem *Methanococcus jannaschii*, což ukazuje na velmi starobylý původ tohoto genu (de Reuse *et al.*, 1997).

Vzhledem ke klíčové roli GlmM v metabolismu buněčné stěny by se tento enzym mohl případně stát potenciálním kandidátem pro vývoj budoucích léčiv zaměřených proti některým bakteriálním patogenům (Yajima *et al.*, 2009; Mehra-Chaudhary *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2013).

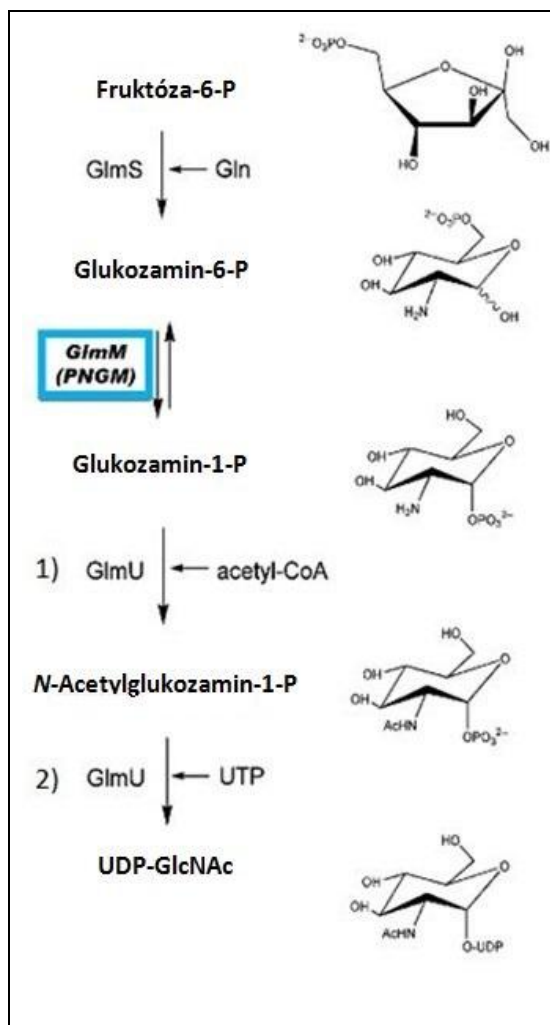
#### **2.4.1 Biosyntetická dráha UDP-N-acetylglukozaminu**

Syntéza UDP-N-acetylglukozaminu (UDP-GlcNAc), vychází z fruktózo-6-fosfátu a probíhá v cytoplazmě postupným sledem čtyř po sobě následujících kroků (Obr. 2.9), během nichž se uplatňují tři enzymy: GlmS (Badet *et al.*, 1987), GlmM (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996) a GlmU (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1993, 1994).

Tato biosyntetická dráha začíná přeměnou fruktózo-6-fosfátu na glukozamin-6-fosfát pomocí amidotransferázy GlmS, která využívá jako zdroj amoniaku L-glutamin (Badet *et al.*, 1987). V dalším kroku se uplatňuje enzym GlmM - fosfoglukozaminmutáza, který katalyzuje reakci, při níž dochází k přeměně glukozamin-6-fosfátu na jeho izomerní sloučeninu glukozamin-1-fosfát (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996). Tato přeměna probíhá přes meziprodukt glukozamin-1,6-bisfosfát (Obr. 2.10) (Jolly *et al.*, 1999; Barreteau *et al.*, 2008). Dráha dále pokračuje za účasti bifunkčního enzymu GlmU, který se uplatňuje při acetylaci a následné uridylaci glukozamin-1-fosfátu ve dvou po sobě následujících krocích za vzniku UDP-GlcNAc (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1994), který je dále modifikován řadou ligáz s označením Mur (Barreteau *et al.*, 2008) a poté inkorporován do peptidoglykanového polymeru za účasti šesti známých PBP u *S. pneumoniae* (Hakenbeck *et al.*, 2012).

UDP-GlcNAc se nachází i u eukaryot, a to především jako stavební složka chitinu nebo některých glykoproteinů. U eukaryot však acetylaci a uridylaci v biosyntetické dráze

UDP-GlcNAc katalyzují dva různé enzymy, přičemž dochází k acetylaci glukozamin-6-fosfátu a nikoli glukozamin-1-fosfátu jako u bakterií. GlmM u eukaryot nebyla nalezena (Barreteau *et al.*, 2008), avšak vyskytují se u nich některé příbuzné enzymy z rodiny  $\alpha$ -D-fosfohexomutáz (Shackelford *et al.*, 2004). Výrazné odlišnosti biosyntetické dráhy UDP-GlcNAc u eukaryot by se však v budoucnosti dalo využít k přípravě nových antibakteriálních látek (Barreteau *et al.*, 2008).



**Obr. 2.9:** Schéma reakčních kroků v biosyntetické dráze UDP-*N*-acetylglukozaminu (popis v textu viz kap. 2.4.1), klíčového prekursoru peptidoglykanu, u grampozitivní bakterie *Bacillus anthracis*. Modrý rámeček označuje fosfoglukozaminmutázu (GlmM), enzym katalyzující reverzibilní přeměnu glukozamin-6-fosfátu na glukozamin-1-fosfát, která probíhá přes meziprodukt glukozamin-1,6-bisfosfát (na schématu není zobrazen). Tuto reverzibilní reakci katalyzují všechny známé enzymy patřící do rodiny  $\alpha$ -D-fosfohexomutáz, které se však liší svou substrátovou specifitou (Shackelford *et al.*, 2004). Převzato z (Mehra-Chaudhary *et al.*, 2011).

#### Vysvětlivky:

**GlmS:** amidotransferáza; **Gln:** glutamin

**GlmM (PNGM):** fosfoglukozaminmutáza

**GlmU** - ve dvou následných reakcích se uplatňuje jako:

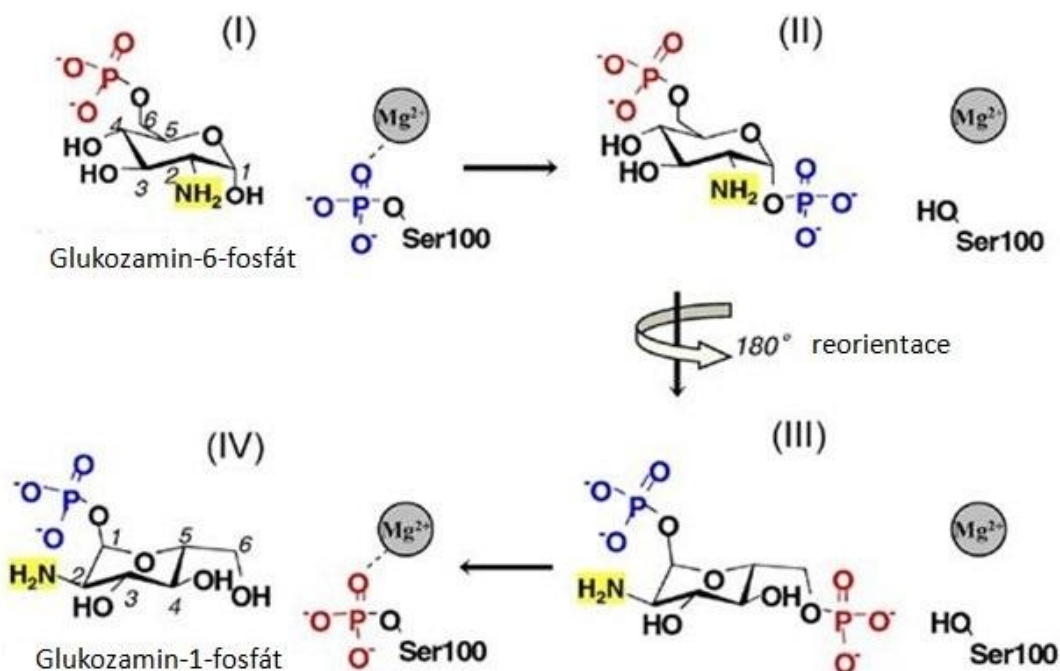
- 1) glukozamin-1-fosfátacetyltransferáza
- 2) *N*-acetylglukozamin-1-fosfáturidyltransferáza

**UDP-GlcNAc:** UDP-*N*-acetylglukozamin

UDP-GlcNAc se nachází i u eukaryot, a to především jako stavební složka chitinu nebo některých glykoproteinů. U eukaryot však acetylaci a uridylaci v biosyntetické dráze UDP-GlcNAc katalyzují dva různé enzymy, přičemž dochází k acetylaci glukosamin-6-fosfátu a nikoli glukosamin-1-fosfátu jako u bakterií. GlmM u eukaryot nebyla nalezena (Barreteau *et al.*, 2008), avšak vyskytují se u nich některé příbuzné enzymy z rodiny  $\alpha$ -D-fosfohexomutáz (Shackelford *et al.*, 2004). V budoucnosti by se dalo výrazné odlišnosti



biosyntetické dráhy UDP-GlcNAc u eukaryot využít k přípravě nových antibakteriálních látek (Barreateau *et al.*, 2008).



**Obr. 2.10:** Schéma možného mechanizmu přeměny glukozamin-6-fosfátu na glukozamin-1-fosfát katalyzované fosfoglukozaminmutázou (GlmM). Římské číslice I-IV označují postupný sled čtyř stavů:

**I)** vazba substrátu na enzym, který je fosforylovaný na konzervovaném Ser zbytku a váže jeden hořečnatý iont jako kofaktor

**II)** přenos zbytku kyseliny fosforečné za vzniku meziprojektu fosforylovaného na dvou místech

**III)** změna prostorové orientace intermediátu

**IV)** tvorba produktu a obnovení původního stavu enzymu (GlmM)

Pro vysvětlení - Ser100 na obrázku je konzervovaný serinový zbytek u GlmM *Bacillus anthracis*.

Přeloženo a převzato z (Mehra-Chaudhary *et al.*, 2011).

## 2.4.2 Charakterizované fosfoglukozaminmutázy u bakteriálních zástupců

### 2.4.2.1 *Escherichia coli*

Fosfoglukozaminmutáza (GlmM) gramnegativní bakterie *E. coli* byla prvním enzymem tohoto druhu popsáným u bakterií (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996). Od té doby se tento enzym nebo přinejmenším jeho gen podařilo identifikovat a charakterizovat také u dalších bakterií (viz kap. 2.4.2.2-9) včetně první strukturní studie.

Bylo zjištěno, že u *E. coli* je enzym GlmM esenciální pro životaschopnost této bakterie. Inaktivace genu *glmM* vede k vyčerpání prekurzorů v biosyntetické dráze peptidoglykanu, morfologickým defektům buněk a nakonec k jejich lyzi, která u nich nastává po poklesu obsahu peptidoglykanu cca pod 60 % obvyklé hladiny. GlmM *E. coli* je syntetizována v podobě neaktivního defosforylovaného enzymu (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996), jehož fosforylace je nutnou podmínkou pro navození jeho aktivního stavu. Ukázalo se, že k udržení aktivního stavu tento enzym vyžaduje kofaktor v podobě difosfátu cukru (Jolly *et al.*, 1999). Bylo zjištěno, že klíčový aminokyselinový zbytek pro fosforylaci GlmM představuje Ser102, jehož přítomnost je nezbytným předpokladem pro autofosforylační aktivitu tohoto proteinu (Jolly *et al.*, 1999, 2000). Doposud však není jasné, jak dochází k aktivaci enzymu *in vivo*.

### 2.4.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* je příležitostný lidský patogen. Pouzdro virulentní formy této gramnegativní bakterie, které ji chrání před fagocytózou makrofágy v hostitelském organismu, obsahuje exopolysacharid alginát (Kato *et al.*, 1990; Leid *et al.*, 2005). U této bakterie byl při pátrání po homologu genu *algC*, který je nezbytný pro biosyntézu lipopolysacharidů a alginátu, odhalen gen *glmM*, jehož produkt byl identifikován jako enzym GlmM. Bylo zjištěno, že gen *glmM* *P. aeruginosa* komplementuje mutovaný gen *glmM* v *E. coli*, avšak není schopen komplementace mutovaného genu *algC* *P. aeruginosa* (Tavares *et al.*, 2000). Další výsledky naznačují, že je gen *glmM* na chromozomu této bakterie součástí operonu pěti genů, jejichž homology se vyskytují také v *E. coli*. Transkripce těchto genů se zvyšuje během časně exponenciální fáze kultury a posléze se snižuje během exponenciální fáze růstu se zvyšující se hustotou buněk. Ve stacionární fázi je úroveň transkripce zanedbatelná (Tavares *et al.*, 2003).

#### 2.4.2.3 *Helicobacter pylori*

*H. pylori* je gramnegativní bakterie vyskytující se v žaludku, kde může způsobovat žaludeční vředy. U této bakterie byl identifikován gen *ureC*, homolog genu *glmM* *E. coli* (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996) se 43% sekvenční identitou (de Reuse *et al.*, 1997) a bylo zjištěno, že jeho produktem je funkční enzym fosfoglukozaminmutáza. Podobně jako u *GlmM* *E. coli* (viz kap. 2.4.2.1) byla v případě *UreC* prokázána esencialita pro životaschopnost *H. pylori*. Gen *ureC* na plasmidovém vektoru je schopen komplementovat podmíněně letální kmen *E. coli* (de Reuse *et al.*, 1997).

#### 2.4.2.4 *Staphylococcus aureus*

Tato grampozitivní bakterie je významným patogenem člověka. Bylo odhaleno, že produktem genu *femR315* (*femD*), jehož identifikaci umožnila inzerční mutagenese s použitím transpozonu Tn551, je enzym fosfoglukozaminmutáza, přičemž bylo dále zjištěno, že enzymový produkt genu *femR315* komplementuje podmíněně letální kmen *E. coli* (Jolly *et al.*, 1997). Tato inzerční mutace má za následek neobvyklé složení buněčné stěny (Wu *et al.*, 1996) a dále sníženou rezistenci k meticilinu a naopak výrazně zvýšenou citlivost k teikoplaninu, což se děje dosud neznámým mechanismem a na produkci penicilin vazebných proteinů (PBPs) se to nijak neprojevilo (Glanzmann *et al.*, 1999).

#### 2.4.2.5 *Mycobacterium smegmatis* a *Mycobacterium tuberculosis*

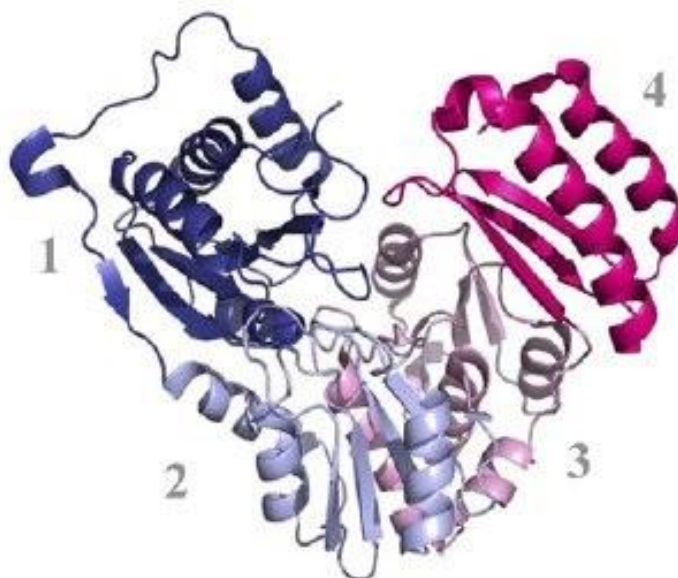
*M. smegmatis* je rychle rostoucí nepatogenní mykobakterie, která je proto vhodnější k provádění výzkumů mykobakterií než samotná *M. tuberculosis*. Bioinformatická analýza odhalila homolog *GlmM* u *M. smegmatis*, který byl označen jako MSMEG\_1556, a také u *M. tuberculosis*, kde byl označen jako Rv3441c. Byla vyzkoušena exprese obou potenciálních proteinů *GlmM* a potvrdilo se, že se jedná o funkční enzymy s fosfoglukozaminmutázovou aktivitou. S použitím termosenzitivního podmíněně letálního kmene  $\Delta glmM$  bylo zjištěno, že enzym *GlmM* je esenciální pro životaschopnost *M. smegmatis*. U *GlmM* *M. tuberculosis* se to nepotvrdilo. Po zvýšení teploty, která vede k vyředění termosenzitivního replikonu a která tak znemožňuje komplementaci *glmM*, začaly buňky vykazovat morfologické defekty jako prodloužený tvar, hrbolatý povrch a někdy nastala i lyze (Li *et al.*, 2012). Na tuto studii navázala další, kde byl připraven kmen  $\Delta glmM$  s inducibilním systémem rekombinantní alely *glmM* založeným na antisense RNA regulovaným pomocí induktoru - tetracyklinu. Byla zjištěna závislost růstové rychlosti kultury na koncentraci tetracyklinu v médiu. Nedostatečná hladina *GlmM* u *M. smegmatis* má za následek sníženou tvorbu biofilmu a zvýšenou citlivost

k antituberkulotikům izoniazidu a etambutolu, které cílí na buněčnou stěnu mykobakterií. Nedostatečná hladina GlmM v buňce se projevila změnami morfologie, které byly prozkoumány pomocí elektronové mikroskopie. Byly zaznamenány buňky větší velikosti nepravidelného tvaru se svraštělým povrchem a rozšířeným tvarem s nižší hustotou ve vzorku (Kang *et al.*, 2013).

#### 2.4.2.6 *Bacillus anthracis*

*B. anthracis* představuje sporogenní grampozitivní bakterii tyčinkovitého tvaru, která se vyskytuje v půdě. Jedná se však o patogenní bakterii, která je původcem onemocnění sněti slezinné neboli anthraxu. Kromě hospodářských zvířat je *B. anthracis* nebezpečný i pro člověka. U GlmM (PNGM) této bakterie byla provedena první a zatím jediná publikovaná strukturní charakteristika tohoto enzymu (Mehra-Chaudhary *et al.*, 2011). Na základě krystalografické strukturní analýzy je predikováno, že GlmM se skládá ze čtyř domén a v roztoku vytváří dimer, což podporují i výsledky z měření dynamického rozptylu světla, které ukazují na přibližně dvojnásobnou molekulovou hmotnost (> 90 kDa) ve srovnání s monomerním (51 kDa, hodnota platí pro GlmM *B. anthracis*). Podle srovnání sekvencí se ukázalo, že aminokyselinové zbytky tvořící rozhraní dimeru GlmM jsou u různých bakterií konzervované, což naznačuje, že se tento enzym vyskytuje ve formě dimeru u mnoha bakterií (Mehra-Chaudhary *et al.*, 2011).

Monomer GlmM *B. anthracis* se skládá ze čtyř domén (Obr. 2.11), které jsou tvořeny 448 aminokyselinovými zbytky. Aktivní místo se nachází ve velké šterbině uprostřed molekuly enzymu. Šterbina aktivního místa je celkově tvořena více než 70 aminokyselinovými (AK) zbytky všech čtyř domén. Rozhraní dimeru je naproti tomu vytvářeno pouze AK zbytky domény 1 z obou monomerů. V aktivním místě se nacházejí čtyři důležité oblasti: I) vysoce konzervovaný serinový zbytek nezbytný pro enzymatickou katalýzu, který je typickým rysem celé rodiny  $\alpha$ -D-fosfohexomutáz (Shackelford *et al.*, 2004), II) vazebné místo pro kofaktor (hořečnatý iont), III) vazebné místo pro substrát a IV) vazebné místo pro fosfát nezbytné pro interakci fosfátové skupiny substrátu a produktu (Mehra-Chaudhary *et al.*, 2011).



**Obr. 2.11:** Stuhkový diagram znázorňující monomer GlmM (PNGM) *B. anthracis*. Číslice 1-4 označují čtyři domény, které jsou rozlišeny podle barev: doména 1 (tmavomodře), doména 2 (světle modře), doména 3 (růžově), doména 4 (červeně). Převzato z (Mehra-Chaudhary *et al.*, 2011).

#### 2.4.2.7 *Streptococcus mutans*

*S. mutans* je fakultativně anaerobní grampozitivní bakterie vyskytující se v ústní dutině člověka, kde se často podílí na vzniku zubního kazu. U této bakterie se podařilo připravit životaschopný kmen  $\Delta glmM$ . GlmM tedy není pro tuto bakterii esenciální. Kmen  $\Delta glmM$  však oproti kmeni divokého typu vytváří dlouhé řetízky buněk a vykazuje sníženou růstovou rychlost během exponenciální fáze i sníženou schopnost tvorby biofilmu a vyšší náchylnost k autolýze, což jsou faktory, které mohou také ovlivňovat virulenci *S. mutans* (Liu *et al.*, 2009).

#### 2.4.2.8 *Streptococcus gordonii*

*S. gordonii*, grampozitivní bakterie kolonizující ústní dutinu člověka a podílející se na vzniku zubního plaku, je dalším streptokokem, u něhož není GlmM esenciální pro životaschopnost, neboť inzerční mutace v genu *glmM* snižuje růstovou rychlost, ale buňky jsou životaschopné. Dále tato mutace způsobuje větší rozmanitost ve velikosti buněk, které zároveň vytvářejí neobvykle dlouhé řetízky, narušuje tvorbu biofilmu a zvyšuje citlivost k penicilinům. Všechny popsané fenotypové projevy se vyskytly také u delečního kmene  $\Delta glmM$ . Bylo zjištěno, že rekombinantní gen *glmM* vnesený do buňky na plazmidu je schopen

komplementovat fenotypové projevy, které vykazuje kmen  $\Delta glmM$  (Shimazu *et al.*, 2008). Jiná studie ukázala, že mutace v genu *glmM* *S. gordonii* způsobuje vyšší citlivost k oxidačním činidlům a lysozymu a tedy k zabíjení polymorfonukleárními leukocyty, neboť u nich zároveň stimuluje produkci superoxidových aniontů a lysozymu k nevratnému poškození buněk tohoto mutantního kmene (Yajima *et al.*, 2009). Nedávno vydaná studie navazující na práci týmu Shimazu *et al.*, (2008) přinesla zjištění, že mutace v genu *glmM* způsobuje vznik velmi dlouhých řetízků buněk *S. gordonii*, výrazné morfologické defekty buněčného povrchu, defekty při dělení buněk a že tyto fenotypové projevy nejsou ovlivněny zdrojem uhlíku (Shimazu *et al.*, 2012).

#### 2.4.2.9 *Streptococcus pneumoniae*

U této grampozitivní bakterie se fosfoglukozaminmutázu (GlmM) podařilo identifikovat jako jeden z potenciálních substrátů eSTK StkP na základě analýzy fosfoproteomu, kdy proteiny pocházející z kultur *S. pneumoniae* byly radioaktivně značeny *in vivo* s použitím  $^{33}\text{P}$ -ortofosfátu, následně rozděleny pomocí dvojrozměrné elektroforézy a posléze analyzovány metodou hmotnostní spektrometrie. Kinázovou reakcí byla potvrzena fosforylace GlmM proteinkinázou StkP *in vitro* (Nováková *et al.*, 2005). GlmM je kódována genem *glmM* (databázové označení *spr1417* u kmene *S. pneumoniae* R6), o délce 1354 pb a je tvořena 450 aminokyselinami ([www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?spr:spr1417](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?spr:spr1417)).

Klíčový aminokyselinový zbytek pro fosforylaci GlmM *S. pneumoniae* je serin (S) v pozici 101 (Pallová, 2007b), který odpovídá S102 u GlmM *E. coli* (Jolly *et al.*, 1999). S102 na rozdíl od GlmM *S. pneumoniae* představuje u GlmM *E. coli* jediné místo fosforylace a na základě výsledků cílené mutagenese bylo zjištěno, že je pro autofosforylační aktivitu tohoto enzymu v *E. coli* zcela nezbytný (Jolly *et al.*, 2000). Na rozdíl od GlmM *E. coli* byl u *S. pneumoniae* jako další místo fosforylace GlmM proteinkinázou StkP s použitím metody hmotnostní spektrometrie určen serin v pozici 99 (Pallová, 2007b). Na základě cílené mutagenese rekombinantní GlmM s použitím mutací vedoucích k záměně S101 za alanin (A), aminokyselinu neumožňující fosforylaci, za vzniku S101AGlmM se ukázalo, že aminokyselinový zbytek S101 je esenciální a enzym GlmM obsahující tuto mutaci není schopen komplementovat podmíněně letální mutaci kmene *E. coli* GPM83. To samé platí i pro záměnu S99 za alanin (S99AGlmM) v případě druhého aminokyselinového zbytku (Pallová, 2007b).

Bylo prokázáno, že GlmM *S. pneumoniae* je schopna komplementovat podmíněně letální kmen *E. coli* GPM83 s inaktivovaným nativním genem *glmM*, jehož funkční kopie leží

na termosenzitivním plazmidu pGMM. Bylo zjištěno, že pro aktivaci enzymu GlmM *in vitro* je důležitá fosforylace proteinkinázou StkP, neboť takto fosforylovaný protein vykazuje nejvyšší specifickou aktivitu, a to nejen v přímé reakci při přeměně glukozamin-6-fosfátu na jeho izomer glukozamin-1-fosfát, ale hlavně v reakci probíhající opačným směrem. Avšak je nutno zmínit, že aktivaci enzymu prostřednictvím jeho autofosforylace nelze vyloučit v podmínkách *in vivo*, a to především z důvodu životaschopnosti kmene  $\Delta stkP$  postrádajícího proteinkinázu StkP (Pallová, 2007b). Není tedy dosud jasné, jakým způsobem je GlmM ovlivněna fosforylací v podmínkách *in vivo*.

Zatímco u bakterií *E. coli* (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996) a *H. pylori* (de Reuse *et al.*, 1997) byla prokázána esencialita genu *glmM* pro jejich životaschopnost, tak např. u streptokoků *S. mutans* (Liu *et al.*, 2009) a *S. gordonii* (Shimazu *et al.*, 2008) se to nepotvrdilo, neboť se pro zmíněný gen podařilo připravit životaschopné mutantní kmeny. Poněvadž se tato práce zabývá analýzou esenciality genu *glmM* pro životaschopnost *S. pneumoniae*, je o enzymu GlmM a nově získaných poznatcích o jeho esencialitě pojednáno dále (viz kap. 5 Výsledky a 6 Diskuze).

### 3. Cíle práce

Hlavním cílem této diplomové práce bylo objasnit, zda je fosfoglukozaminmutáza (GlmM) esenciální pro životaschopnost *S. pneumoniae* a dále zjistit, jestli je pro funkčnost GlmM esenciální fosforylace klíčových serinových zbytků na pozicích 99 a 101. Za tímto účelem byly stanoveny následující dílčí úkoly:

1. Připravit integrační vektor nesoucí gen *glmM* pod kontrolou indukibilního promotoru.
2. Vytvořit merodiploidní kmen *S. pneumoniae* obsahující nativní gen *glmM* a jeho ektopickou kopii pod kontrolou indukibilního promotoru.
3. Provést delecí nativního genu *glmM* v merodiploidních kmenech a vytvořit tak mutantní kmen.
4. Analyzovat esencialitu GlmM pro životaschopnost *S. pneumoniae*
5. Vytvořit modifikované merodiploidní kmeny obsahující pod zinkovým promotorem ektopickou kopii genu *glmM* s mutacemi vedoucími k záměnám serinu 99, nebo 101 za alanin, nebo kyselinu glutamovou.
6. V modifikovaných merodiploidních kmenech provést delecí nativního genu *glmM* transformací lineárním konstruktem a výsledky dále analyzovat.



## 4. Materiál a metodika

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Bakteriální kmeny

##### *Escherichia coli*:

*E. coli* **DH5α** (*fhuA2*  $\Delta$ (*argF-lacZ*)*U169* *phoA* *glnV44*  $\Phi$ 80  $\Delta$ (*lacZ*)*M15* *gyrA96* *recA1relA1* *endA1* *thi-1* *hsdR17*) pro propagaci plazmidových vektorů.

##### *Streptococcus pneumoniae*:

*S. pneumoniae* **Sp1** (Rx derivát; *strI*, *hexA*) (Morrison *et al.*, 1983): výchozí nevirulentní kmen pro experimenty, nese chromozomální rezistenci k streptomycinu.

*S. pneumoniae* **Sp208** (R6) (Ottolenghi a Hotchkiss, 1962): nevirulentní kontrolní kmen, senzitivní ke streptomycinu. Kmen poskytl Dr. M. Oggioni (Univerzita Siena, Itálie).

*S. pneumoniae* **Sp225** (R6; gen *rpsL* z Rx derivátu) (A. Ulrych, nepublikované výsledky): výchozí nevirulentní kmen pro experimenty odvozený od kmene Sp208 a obsahující recesivní alelu genu *rpsL*, která uděluje rezistenci k streptomycinu.

#### 4.1.2 Vektory

**pJWV25** (Eberhardt *et al.*, 2009) je plasmidový vektor o velikosti 8587 pb, který obsahuje inducibilní zinkový promotor  $P_{czcD}$  a dvojici sekvencí *gatC* a *bgaA*, pomocí nichž je možné vektor použít pro vložení konstruktů homologní rekombinací do neesenciálního lokusu *bgaA* nacházejícího se na chromosomu *S. pneumoniae*. Vektor dále obsahuje gen *tetR* kódující rezistenci k tetracyklinu sloužící jako selekční marker. pJWV25 byl navržen pro expresi proteinů ve *S. pneumoniae*, které jsou fúzované s GFP (Green Fluorescent Protein - zelený fluorescenční protein). Štěpením pJWV25 restriční endonukleázou *PvuI* došlo k linearizaci tohoto vektoru, jenž byl později použit pro přípravu kmenů **Sp217** (Sp1 *bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG*) a **Sp245** (Sp225 *bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG*). pJWV25 byl použit také pro amplifikaci zinkového promotoru  $P_{czcD}$ .

**pTrcHis60** (Pompeo *et al.*, 1998) je plazmidový expresní vektor odvozený od plazmidu pTrc99A (Pharmacia), který byl připraven za účelem nadprodukce fosfoglukozaminmutázy GlmM *S. pneumoniae*. Protein GlmM je v tomto vektoru fúzována s histidinovým epitopem na C-konci. Vektor poskytl Dr. D. Mengin-Lecreulx (Univerzita Paříž XI, Francie). pTrcHis60 byl v této práci použit pro amplifikaci genu *glmM*.

**Janus kazeta** (Sung *et al.*, 2001) je lineární DNA konstrukt o délce 1333 pb a slouží k delecí genů na chromozomu *S. pneumoniae*. Obsahuje gen *kan* kódující rezistenci ke kanamycinu a dominantní alelu genu *rpsL*, která uděluje senzitivitu k streptomycinu. JanusK poskytl Dr. D. A. Morrison (Univerzita Illinois, Chicago, USA).

JanusK byla použita pro přípravu kmenů s delecí nativního genu *glmM*: **Sp261** (Sp1  $\Delta glmM::janus/bgaA::P_{czcD}-glmM-FLAG$ ) a **Sp263** (Sp225  $\Delta glmM::janus/bgaA::P_{czcD}-glmM-FLAG$ ) viz kapitola 5 Výsledky.

### 4.1.3 Půdy a média

Množství jednotlivých přísad, pokud není uvedeno jinak, je zde udáváno na 1 litr média, do celkového objemu se doplňují destilovanou vodou a následně se sterilizují. Do pevných půd byl přidán 1,5% agar. Příprava selekčních půd se uskutečnila přidáním příslušného antibiotika ze zásobního roztoku (*E. coli*: ampicilin 100 µg/ml; *S. pneumoniae*: tetracyklin 2,5 µg/ml, kanamycin 50 µg/ml, streptomycin 50 µg/ml, rifampicin 1 µg/ml) v potřebné koncentraci do média, které bylo vychlazené na cca 45°C.

Kultivace *E. coli* probíhala za aerobních podmínek při stálém třepání a teplotě 37°C. V případě *S. pneumoniae* probíhala staticky bez aerace při 37°C, pokud není uvedeno jinak.

#### Kultivace *E. coli*:

**LB médium:** trypton 10 g; kvasinkový extrakt 5 g; NaCl 10 g; pH 7,5

**SOB médium:** trypton 20 g; kvasinkový extrakt 5 g; NaCl 0,58 g; KCl 0,186 g; po sterilizaci byl přidán: 1 M MgCl<sub>2</sub> 10 ml; 1 M MgSO<sub>4</sub> 10 ml

### **Kultivace *S. pneumoniae*:**

**TSB médium** (Oxoid): TSB (Tryptic Soy Broth) 30 g - dodáváno jako směs

**C+Y médium** - chemicky definované médium (Lacks a Hotchkiss, 1960) s přidavkem kvasinkového extraktu (Yeast extract), skládá se z následujících složek:

**PreC:** L-cystein hydrochlorid 11,25 mg; octan sodný 2 g; kaseinový hydrolyzát 5 g; L-tryptofan 6 mg;  $K_2HPO_4$  (bezvodý) 8,5 g; sterilizace autoklávem; uchovávat ve tmě při pokojové teplotě

Další složky:

3% **L-glutamin** - uchovávat při  $-20^{\circ}C$ ;

2% **pyrohroznán sodný**; 8% **BSA** (pouze v případě kmenů odvozených od *S. pneumoniae* R6);  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  79 mg; **uridin-adenozin**: uridin 2 g + adenzin 2 g; **sacharóza** 513,4 g; 20 % **glukóza**; uchovat při  $4^{\circ}C$ ; 10% **kvasinkový extrakt** - filtrován na celitovém filtru pomocí vakuové filtrační kolony od firmy Nalgene; kromě glukózy a PreC (sterilizace autoklávem) se uvedené tučně označené složky C+Y média sterilizují filtrací

**ADAMS III:** 160 ml ADAMS I; 4 ml ADAMS II; L-asparagin (bezvodý) 175 mg; cholin 200 mg;  $CaCl_2$  (bezvodý) 500 mg;  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  20 g; pH 7,6; sterilizace filtrací; uchovávat při  $4^{\circ}C$

ADAMS I: biotin 150 mg; kyselina nikotinová 150 mg; pyridoxin hydrochlorid 175 mg; pantotenát vápenatý 600 mg; tiamin hydrochlorid 160 mg; riboflavin 70 mg

ADAMS II:  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  1g;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  1 g;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  1 g;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  0,4 g  
Roztoky ADAMS I a II: sterilizace varem; uchovávat při  $4^{\circ}C$

Pro přípravu všech složek byla použita deionizovaná  $H_2O$ . Před použitím média byly složky, které jsou zvýrazněné tučným písmem, smíchány (Tab. 4.1) a pH upraveno pomocí 1N HCl na hodnotu 6,8

Složka	Objem
Pre-C	894,96
glukóza 20%	8,95
ADAMS III	22,37
L-glutamin 3% *	653,32
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O *	894,96
pyrohroznán sodný 2%	13,42
sacharóza *	563,83
uridin-adenozin	8,95
BSA 8% **	8,95
kvasinkový extrakt 10%	22,37
HCl 1N	17,90

**Tab. 4.1:** Objemy zásobních roztoků složek, jejichž složení je uvedeno výše, pro přípravu C+Y média v mililitrech (ml), složky označené symbolem \* jsou udávány v mikrolitrech (μl), symbol \*\* znamená, že složka se používá pouze pro kmeny odvozené od kmene *S. pneumoniae* R6.

**Gelóza G** (pevné médium): glukóza 1 g; NaCl 5 g; neopepton 5 g; Tris-base 1,25 g; casiton 10 g; agar 10 g

**Krevní agar** (LabMediaServis): krevní agar Columbia 5% beraní defibrinovaná krev; pokud bylo třeba, byl na krevní agar kromě selekčního antibiotika přidáván také ZnCl<sub>2</sub>

#### 4.1.4 Pufry a roztoky

##### **Elektroforetická separace DNA na agarózovém gelu:**

TAE pufr 40 mM Tris; 2 mM EDTA; pH 8,5

Loading dye 6x (Fermentas)

##### **SDS PAGE:**

Elektroforetický pufr 0,025 M Tris; 0,192 M glycín; 0,1 % SDS; pH 8,3

Vzorkový pufr 5x 350 mM Tris; 20% glycerol; 15% SDS; 25% β-merkaptóetanol; bromfenolová modř; pH 6,8

**Přenos proteinů na membránu a imunodetekce:**

Blotovací pufr	48 mM Tris; 39 mM glycín; 0,0375% SDS; 20% metanol
TBS-T	20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,05% Tween 20; pH 7,6
Roztok amidové černě	40% metanol; 10% kyselina octová; 0,1% amidová čern

**Izolace plazmidové DNA *E. coli*:**

Roztok PEB I	50 mM glukóza; 25 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; pH 8,0
Roztok II	0,2 M NaOH; 1% SDS
Roztok III	3 M octan draselný, pH 4,8
TE pufr	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8.0

**Příprava kompetentních buněk *E. coli*:**

TB pufr	10 mM PIPES; 15 mM CaCl <sub>2</sub> ; 250 mM KCl; sterilizováno filtrací, následně přidáno MnCl <sub>2</sub> do výsledné koncentrace 55 mM; pH 6,7
---------	---

**Izolace chromozomální DNA *S. pneumoniae*:**

DCNa-SDS	0,5% deoxycholát sodný; 0,25% SDS
NaCl-EDTA	150 mM NaCl; 30 mM EDTA; pH 8,0
SEDS	NaCl-EDTA + DCNa-SDS (24:1)

**Ligace DNA:**

T4 DNA pufr	40 mM tris-HCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM DTT; 0,5 mM ATP; pH 7,8
-------------	--

**4.1.5 Chemikálie**

Název chemikálie	Firma	Zkratka
2' - deoxyadenozin - 5' - trifosfát	Promega	dATP
2' - deoxycytidin - 5' - trifosfát	Promega	dCTP
2' - deoxyguanozin - 5' - trifosfát	Promega	dGTP
2' - deoxytymidin - 5' - trifosfát	Promega	dTTP
Adenozin	Sigma	
Agaróza	Sevac	

SeaKem <sup>®</sup> GTG <sup>®</sup> agaróza	Lonza	
Akrylamid	Sevac	
Ampicilin	Sigma	Amp
Bacto-agar	BD company	
Biotin	Sigma	
Bromfenolová modř	Lachema	BPB
Casiton	BD company	
Competence stimulating peptide	Biopharm	CSP
Deoxycholát sodný	Merck	DCNa
Dimetylsulfoxid	Sigma	DMSO
Ditiotreitol	Promega	DTT
Dodecylsulfát sodný	Serva	SDS
D-glukóza	Lachema	
Gel red	Roche	
Glukóza	Sigma	
Glycin	Sigma	
Heptahydrát síranu zinečnatého	Sigma	ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O
Heptahydrát síranu železnatého	Sigma	FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O
Hexahydrát chloridu manganatého	Sigma	MnCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O
Chlorid vápenatý	Sigma	CaCl <sub>2</sub>
Cholin	Sigma	
Kanamycin	Sigma	Kan
Kaseinový hydrolyzát	Sigma	
Kys. etylenaminotetraoctová, dvojná sůl, p.a.	Serva	EDTA
Kys. chlorovodíková	Sigma	
Kys. nikotinová	Sigma	
Kvasinkový extrakt	Sigma	
L-asparagin	Sigma	
L-cystein hydrochlorid	Sigma	
L-glutamin	Sigma	
L-tryptofan	Sigma	
Neopepton	Difco	

Pantotenát vápenatý	Sigma	
Pentahydrát síranu měďnatého	Sigma	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Peroxosíran amonný	Lachema	APS
Propidium jodid	Invitrogen	PI
Proteináza K	Boehringer Mannheim	
Pyridoxin hydrochlorid	Sigma	
Pyrohroznán sodný	Sigma	
N, N, N', N' - tetrametyletylendiamin	Serva	TEMED
Riboflavin	Sigma	
RNáza A	Promega	
Sacharóza	Sigma	
Syto9	Invitrogen	
Tetrahydrát chloridu manganatého	Sigma	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Tiamin hydrochlorid	Sigma	
Tris(hydroxymetyl)aminometan	Sigma	Tris-base
Tris(hydroxymetyl)aminometan, hydrochlorid	Sigma	Tris-HCl
Trypton pepton	Difco	
Tween 20	Sigma	
Uridin	Sigma	

#### 4.1.6 Enzymy

##### Modifikační enzymy:

Phusion High Fidelity DNA polymeráza	Fermentas
LA polymeráza	Top-Bio
T4 DNA ligáza	Fermentas

##### Restrikční enzymy:

<i>DpnI</i>	New England BioLabs (NEB)
<i>EcoRI</i>	NEB
<i>NheI</i>	NEB
<i>NotI</i>	NEB
<i>PvuI</i>	NEB
<i>SacI</i>	NEB

#### **4.1.7 Protilátky**

##### **anti-FLAG F7425 (Sigma)**

primární králičí polyklonální protilátka proti FLAG-epitopu

##### **anti-Rabbit IgG-Peroxidase A0545 (Sigma)**

sekundární kozí polyklonální protilátka proti králičí protilátce konjugovaná s křenovou peroxidázou

#### **4.1.8 Komerční soupravy a standardy**

##### **Komerční soupravy:**

Min Elute <sup>TM</sup> Reaction Cleanup Kit (Qiagen)	přečištění DNA
QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)	izolace DNA z agarózového gelu
QIAprep <sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (Qiagen)	izolace plasmidové DNA
SuperSignal <sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce)	vyvolání chemiluminiscenčního signálu při imunodetekci
Live/Dead <sup>®</sup> BacLight <sup>TM</sup> Bacterial Viability Kits (Invitrogen)	rozlišení živých a mrtvých buněk barvicí technikou
QuikChange <sup>®</sup> II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)	cílená mutageneze

##### **Proteinové a DNA standardy:**

Prestained Protein Marker	NEB
GeneRuler <sup>TM</sup> 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Scientific

#### **4.1.9 Počítačová analýza**

<b>DNASTAR<sup>®</sup> Lasergene v. 8.1</b>	sestavování map klonovacích vektorů; návrh oligonukleotidů
<b>Cell<sup>R</sup> v. 2.0</b>	Mikroskopování - zobrazování obrazu z kamery Olympus FV2T Digital B/W



<b>Primer 3 verze 0.4.0</b>	návrh oligonukleotidů
<b>www.genomics.agilent.com</b>	návrh oligonukleotidů pro cílenou mutagenezi
<b>www.genome.jp/kegg</b>	analýza sekvencí DNA
<b>www.ncbi.nlm.nih.gov</b>	analýza a porovnávání sekvencí DNA

#### 4.1.10 Použité oligonukleotidy

Označení	Sekvence 5' → 3'	Použití
LN123 F	TTCGCTACTTGGAGCCACTAT	amplifikace <i>P<sub>czcD</sub></i>
JK001 R	CCCAAAATATTTACCCATATTTGCCTCCTTAAGATCC	amplifikace <i>P<sub>czcD</sub></i>
JK002 F	AAGGAGGCAAATATGGGTAAATATTTTGGGACTG	amplifikace <i>glmM</i>
JK005 R	ATTAGCGGCCGCTTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATC GTCAATCCCAATTTTCAGCACG	amplifikace <i>glmM</i> (FLAG-epitop)
JG28 F	CCGTTTGATTTTTAATGGATAATG	amplifikace JanusK
JG29 R	GGGCCCCCTTCCTTATGCTT	amplifikace JanusK
JK006 F	AACGTATCGCTGTGACGTCT	amplifikace oblasti ležící ve směru transkripce před nativním genem <i>glmM</i>
JK007 R	CATTATCCATTAATAAATCAAACGGTGTTAGCTCTAGGTTAGCTTC	amplifikace oblasti ležící ve směru transkripce před nativním genem <i>glmM</i>
JK008 F	AAGCATAAGGAAAGGGGCCCGTTGATACCATCACAGATGTAG	amplifikace oblasti ležící ve směru transkripce za nativním genem <i>glmM</i>
JK009 R	TCAATTAAGCGCTTGTTGGC	amplifikace oblasti ležící ve směru transkripce za nativním genem <i>glmM</i>
JK010 F	GTTGATACCATCACAGATGTAG	amplifikace oblasti ležící ve směru transkripce za nativním genem <i>glmM</i>
JK011 R	CTACATCTGTGATGGTATCAACTGTTAGCTCTAGGTTAGCTTC	amplifikace oblasti ležící ve směru transkripce před nativním genem <i>glmM</i>
JK012 R	AATGACCCGGTATTGACCTG	ověřování správné integrace konstruktů JanusKΔ <i>glmM</i> nebo ΔJanus
JK013 F	ACACAGGAGAATGTAGATGCC	ověřování správné integrace konstruktů JanusKΔ <i>glmM</i>
LN142 R	AGGACAAGAGTTTTTCTTTGG	ověřování správné integrace <i>P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG</i> do <i>bgaA</i> lokusu <i>S.p</i>

**Tab. 4.2:** Seznam a popis použitých oligonukleotidů.

F a R značí orientaci oligonukleotidu. Podtržením je vyznačeno restrikční místo pro *NotI*; tučně je vyznačen STOP kodon, modře sekvence FLAG-epitopu **CTTATCGTCGTCATCCTTGTAATC**

Všechny oligonukleotidy byly objednány u firmy Generi Biotech nebo Metabion international AG.

## **4.2 Metodika**

### **4.2.1 Manipulace s DNA**

#### **Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

Oligonukleotidy, které jsme v této práci používali, byly navrženy pomocí programu Primer 3 verze 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) a Primer select (Lasergene). Byly syntetizovány firmou Generi Biotech nebo Metabion international AG a v jejich seznamu (Tab. 4.2) je pro každý oligonukleotid uveden název sekvence, použití a případné umístění navrženého restrikčního místa. Pro klonovací účely při konstrukci expresních plazmidů jsme používali Phusion High Fidelity DNA polymerázu (Fermentas), neboť je přesná a bezchybová. Pro kontrolní PCR reakce na ověření správnosti připravených konstruktů jsme používali LA polymerázu (Top-Bio), a to buď na chromozomální DNA nebo přímo na koloniích (standardní podmínky + 10% Tween 20, který narušuje celistvost buněčné stěny bakterií, a jako templát byla sterilním párátkem přidána kolonie vyrostlá na pevném médiu). Složení reakční směsi a amplifikační podmínky byly dodržovány podle pokynů od výrobce. Bezchybnost amplifikací byla ověřena sekvenací.

#### **Štěpení restrikčními endonukleázami**

Restrikční endonukleázy typu II jsou enzymy, které rozpoznávají určitou sekvenci na DNA a následně v tomto místě provedou specifické štěpení za vzniku fragmentů s definovanými konci. Během práce s restrikčními enzymy jsme dodržovali pokyny výrobce (New England Biolabs). V případě potřeby byly fragmenty vzniklé štěpením přečištěny s použitím komerční soupravy MinElute<sup>TM</sup> Reaction Cleanup Kit (Qiagen).

#### **Ligace**

Ligaci molekul DNA provádějí enzymy ligázy, které katalyzují spojování fragmentů DNA. K tomuto procesu byla použita T4 DNA ligáza (Fermentas) v reakční směsi o celkovém objemu 20 µl při laboratorní teplotě a molárním poměru mezi vektorem a inserčním fragmentem 1:2. Součástí ligační směsi byl odpovídající pufr: T4 DNA pufr. Reakční směs jsme nechali inkubovat přes noc. Podmínky reakce byly dodrženy podle pokynů od výrobce (Fermentas).

## **Elektroforetická separace DNA na agarózovém gelu**

Pro rozdělení fragmentů DNA o rozdílné velikosti byla použita horizontální agarová gelová elektroforéza. Princip této elektromigrační metody je založen na odlišné pohyblivosti fragmentů DNA ve stejnosměrném elektrickém poli. Rychlost pohybu těchto fragmentů v agarózovém gelu je závislá na více faktorech: koncentraci gelu, molekulové hmotnosti i konformaci biomolekul. Vzorky byly nanášeny ve směsi obsahující 6x Loading Dye (Fermentas) a elektroforéza probíhala v TAE pufru při napětí 5V/cm. Za účelem zviditelnění fragmentů DNA pod ultrafialovým světlem bylo do gelu přidáváno barvivo Gel Red (Roche), přičemž velikost fragmentů byla určována pomocí standardu GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

## **Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu**

Konkrétní fragmenty DNA rozdělené podle velikosti byly v případě potřeby izolovány z agarózového gelu s použitím komerční soupravy QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) podle návodu od výrobce.

## **Příprava merodiploidních kmenů včetně kmenů, které v ektopické kopii genu *glmM* obsahují modifikace zavedené cílenou mutagenezí**

Pro vytvoření konstruktu nesoucího kopii genu *glmM* pod kontrolou inducibilního zinkového promotoru  $P_{czcD}$  jsme nejprve amplifikovali pomocí PCR oblast zmíněného zinkového promotoru. Amplifikace proběhla pomocí oligonukleotidů LN123 a JK001 a plazmidu pJWV25 (Eberhardt *et al.*, 2009) jako templátu (viz kap. 5 Výsledky Obr. 5.2). Vlastní gen *glmM* byl amplifikován pomocí oligonukleotidů JK002 a JK005 za použití plazmidu pTrcHis60 jako templátu. Používali jsme Phusion High Fidelity DNA polymerázu (Fermentas) a podmínky reakcí nastavili na základě návodu od výrobce. Gen *glmM* z plazmidu pTrcHis60 sice obsahuje sekvenci pro C-koncový histidinový epitop, avšak to bylo možné obejít použitím oligonukleotidu JK005, který je komplementární k sekvenci nacházející ve směru transkripce těsně před sekvencí pro histidinový epitop a STOP kodon. Jelikož 5' koncová část JK005 zavádí do amplifikovaného genu *glmM* sekvenci pro FLAG-epitop a STOP kodon, je sekvence *glmM* kompletní, avšak neobsahuje sekvenci histidinového epitopu, nýbrž požadovaného FLAG-epitopu. Následně jsme oba amplifikované fragmenty (oblast  $P_{czcD}$  a *glmM*-FLAG) spojili s použitím fúzní PCR (viz kap. 5 Výsledky Obr. 5.2) pomocí oligonukleotidů LN123 a JK005, které jsou komplementární k okrajům nově vzniklého fúzního fragmentu, čímž vznikl fúzní fragment  $P_{czcD}$ -*glmM*-FLAG.

Fúzní fragment  $P_{czcD}$ -*glmM*-FLAG štěpený restrikcími enzymy *NotI*-*EcoRI* jsme klonovali do vektoru pJWV25 štěpeného rovněž pomocí *EcoRI*-*NotI*. Restrikční místo *EcoRI* se nachází v sekvenci mezi oligonukleotidem LN123 a promotorovou oblastí  $P_{czcD}$  na plazmidu pJWV25, zatímco restrikční místo *NotI* bylo navrženo přímo jako součást oligonukleotidu JK005. Nově vzniklý plazmidový konstrukt **pZn-GlmM-FLAG** (viz kap. 5 Výsledky Obr. 5.3 a 5.5) byl lineárizován restrikcí enzymem *PvuI* a následně transformován do divokých kmenů *S. pneumoniae* Sp1 a Sp225 za vzniku merodiploidních kmenů **Sp217** (Sp1 *bgaA*:: $P_{czcD}$ -*glmM*-FLAG) a **Sp245** (Sp225 *bgaA*:: $P_{czcD}$ -*glmM*-FLAG), které byly selektovány na rezistenci k tetracyklinu. Plazmid **pZn-GlmM-FLAG** je odvozený od plazmidu pJWV25 umožňujícího integraci fúzního fragmentu  $P_{czcD}$ -*glmM*-FLAG do neesenciálního lokusu *bgaA* na chromozomu *S. pneumoniae* za vzniku merodiploidního kmene nesoucího dvě kopie *glmM* - kromě nativní ještě ektopickou kopii genu *glmM* pod inducibilní kontrolou  $P_{czcD}$ .

Pomocí cílené mutagenze byly dále vytvořeny čtyři merodiploidní kmeny **Sp268-271** (Sp1 *bgaA*:: $P_{czcD}$ -*glmM* S99A/S101A/S99E/S101E-FLAG), které také nesou dvě kopie genu *glmM*, ovšem každý z těchto čtyř kmenů obsahuje v ektopicky kódovaném genu *glmM* určitou mutaci způsobující záměnu jednoho ze dvou klíčových aminokyselinových zbytků pro fosforylaci (S99 nebo S101) buď za alanin (A), nebo za kyselinu glutamovou (E).

### **Příprava konstruktů pro delecí nativního genu *glmM* a příprava mutantních kmenů $\Delta$ *glmM*/*bgaA*:: $P_{czcD}$ -*glmM*-FLAG**

Lineární konstrukt o délce 3619 pb pro delecí nativního genu *glmM* ležícího na chromozomu *S. pneumoniae* ve své střední části obsahuje Janus kazetu (JanusK) (Sung *et al.*, 2001) o délce 1333 pb a v obou koncových částech homologní sekvence s okolními sekvencemi genu *glmM* (viz kap. 5 Výsledky Obr. 5.9) umožňující homologní rekombinaci. Pro jeho přípravu jsme používali PCR a Phusion High Fidelity DNA polymerázu a podmínky reakcí nastavili na základě návodu od výrobce (Fermentas). Nejprve jsme amplifikovali JanusK s použitím oligonukleotidů JG28 a JG29 z totožného templátu. Homologní oblasti byly amplifikovány z chromozomální DNA kmene divokého typu Sp1 - oblast odpovídající sekvenci před genem *glmM* ve směru transkripce pomocí oligonukleotidů JK006 a JK007 a oblast za genem pomocí oligonukleotidů JK008 a JK009. Celý konstrukt vznikl spojením těchto tří připravených fragmentů s použitím fúzní PCR a oligonukleotidů JK006 a JK009, které jsou komplementární ke koncovým sekvencím konstruktů. Spojení fragmentů ve fúzní PCR bylo umožněno prostřednictvím koncových komplementárních sekvencí k okrajovým

sekvencím JanusK, které byly zavedeny prostřednictvím oligonukleotidů JK007 a JK008. Tento nově vzniklý lineární konstrukt **JanusK $\Delta$ glmM** jsme použili pro delecí nativního genu *glmM* na chromozomu *S. pneumoniae* (viz kap. 5 Výsledky Obr. 5.11) u merodiploidních kmenů nesoucích dvě kopie genu *glmM* - Sp217 a Sp245 za účelem vytvoření mutantních kmenů **Sp261** (Sp1  $\Delta$ glmM::*janus/bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG*) a **Sp263** (Sp225  $\Delta$ glmM::*janus/bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG*) a stejným způsobem jsme se snažili provést delecí nativního genu *glmM* také u merodiploidních kmenů Sp268-271. Mutantní kmeny jsme se snažili připravit transformací konstruktů JanusK $\Delta$ glmM do příslušných merodiploidních kmenů *S. pneumoniae* (Sp217, Sp245 a také Sp268-271) v přítomnosti různých koncentrací ZnCl<sub>2</sub> v médiu jako induktoru exprese proteinu GlmM, který je pod kontrolou zinkového indukibilního promotoru P<sub>czcD</sub>. Selektce těchto mutantních kmenů byla provedena na základě rezistence ke kanamycinu a senzitivity ke streptomycinu.

### **Příprava konstruktů pro delecí JanusK a příprava neznačených mutantních kmenů**

Při přípravě lineárního konstruktů pro delecí JanusK (viz kap. 5 Výsledky Obr. 5.10) o délce 2286 pb jsme postupovali podobně jako u konstruktů JanusK $\Delta$ glmM. S použitím PCR jsme amplifikovali homologní oblasti ohraničující nativní gen *glmM* - oblast proti směru transkripce pomocí oligonukleotidů JK006 a JK011 a oblast ve směru transkripce pomocí JK010 a JK009, abychom posléze tyto dvě oblasti spojili prostřednictvím okrajových oligonukleotidů JK006 a JK009 ve fuzní PCR. Oligonukleotidy JK011 a JK010 byly navrženy tak, aby při fuzní PCR umožnily komplementární spojení obou homologních fragmentů. Konstrukt pro delecí JanusK jsme nazvali  **$\Delta$ Janus**. Konstrukt  $\Delta$ Janus se použije pro transformaci mutantních kmenů Sp261 a Sp263, přičemž selektce bude provedena na základě rezistence ke streptomycinu a senzitivity ke kanamycinu.

### **Cílená mutagenese**

Tato metoda je založena na metodě PCR a amplifikaci obou vláken plazmidu pomocí oligonukleotidů obsahujících mutaci, která způsobí požadovanou záměnu aminokyseliny. Po tomto kroku se provede degradace mateřského vlákna s použitím restrikční endonukleázy *DpnI*, která rozpoznává metylované sekvence (5'-Gm<sup>6</sup>ATC-3'), které následně specificky štěpí. V reakční směsi tak zůstane pouze nově syntetizovaná DNA s požadovanou mutací.

K provedení cílené mutagenese jsme použili komerční soupravu QuikChange<sup>®</sup> II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) a postupovali podle návodu od výrobce. Jako templát byl použit plazmidový vektor pZn-GlmM-FLAG. Za účelem vnesení mutace do genu *glmM*

ležícím na zmíněném klonovacím plazmidovém vektoru, která by měla za následek záměnu vždy jedné z klíčových aminokyselin pro fosforylaci GlmM, tedy S99 a S101 za alanin (A), nebo kyselinu glutamovou (E), jsme vždy použili dva oligonukleotidy (Tab. 4.3), přičemž každý z nich je komplementární k opačnému vlákně vektoru. Alanin (A) je aminokyselina, která neumožňuje fosforylaci, kyselina glutamová (E) představuje aminokyselinu, která napodobuje fosforylovaný stav. Výsledkem PCR reakcí cílené mutagenese bylo vytvoření čtyř modifikovaných plazmidových vektorů, které byly transformovány do kmene divokého typu (WT) Sp1 a selektovány na rezistenci k tetracyklinu za vzniku čtyř merodiploidních kmenů Sp268-271 (Tab. 4.4).

Označení oligonukleotidu	Záměna	Sekvence 5' → 3'
S99A	S99A	GCAAGTGCCGGTGTTCATGATTCTGGCTAGCCACA
S99A antisense*	S99A	TGTGGCTAGCAGCAATCATGACACCGGCACTTGC
S101A	S101A	CGGTGTCATGATTTCTGCTGCCACAACCCAGCC
S101A antisense*	S101A	GGCTGGGTTGTGGGCAGCAGAAATCATGACACCG
S99E	S99E	GAGCAAGTGCCGGTGTTCATGATTGAGGCTAGCCACAACCCAG
S99E antisense*	S99E	CTGGGTTGTGGCTAGCCTCAATCATGACACCGGCACTTGCTC
S101E	S101E	CCGGTGTTCATGATTTCTGCTGAGCACAACCCAGCCCTTGATAA
S101E antisense*	S101E	TTATCAAGGGCTGGGTTGTGCTCAGCAGAAATCATGACACCGG

**Tab. 4.3:** Oligonukleotidy použité pro cílenou mutagenesi genu *glmM*.

Označení symbolem \* znamená opačnou orientaci oligonukleotidu. Podtrženým tučným písmem jsou vyznačeny mutované kodony.

Oligonukleotidy pro cílenou mutagenesi byly navrženy pomocí webové softwarové aplikace firmy Agilent Technologies, Inc. ([www.genomics.agilent.com](http://www.genomics.agilent.com)) a objednány u firmy Geneti Biotech.

Vytvořený vektor	Kmen vytvořený transformací vektoru do WT kmene Sp1	Genotyp vytvořeného kmene
pZn-GlmM-S99A-FLAG	Sp268	Sp1 <i>bgaA::P<sub>c<sub>zcd</sub></sub>-glmM-S99A-FLAG</i>
pZn-GlmM-S101A-FLAG	Sp269	Sp1 <i>bgaA::P<sub>c<sub>zcd</sub></sub>-glmM-S101A-FLAG</i>
pZn-GlmM-S99E-FLAG	Sp270	Sp1 <i>bgaA::P<sub>c<sub>zcd</sub></sub>-glmM-S99E-FLAG</i>
pZn-GlmM-S101E-FLAG	Sp271	Sp1 <i>bgaA::P<sub>c<sub>zcd</sub></sub>-glmM-S101E-FLAG</i>

**Tab. 4.4:** Shrnutí výsledků cílené mutagenese a transformace modifikovaných vektorů do kmene Sp1

## 4.2.2 Manipulace s proteiny

### SDS PAGE (SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza)

K rozdělení proteinů v elektrickém poli podle jejich molekulové hmotnosti byla použita vertikální SDS-PAGE v aparatuře od společnosti ATTO corporation. Než se proteinový vzorek nanese na polyakrylamidový gel, je nutné k němu nejprve přidat SDS vzorkový pufr a inkubovat jej při teplotě 100°C po dobu 10 minut, čímž dojde k denuraci proteinů. Na gel bylo vždy naneseno po 15 µl od každého vzorku lyzátu. Používali jsme 12% separační gel a 4% zaostřovací gel (Tab. 4.5).

Gel	30% akrylamid	1,5M Tris pH 8,8	0,5M Tris pH 6,8	10% SDS	H <sub>2</sub> O	TEMED	10% APS	Celk. objem
Separací 12%	8 ml	5 ml	-	200 µl	6,6 ml	20 µl	200 µl	20 ml
Zaostřovací 4%	800 µl	-	1,5 ml	60 µl	3,6 ml	7,5 µl	60 µl	6 ml

**Tab. 4.5:** Příprava jednoho polyakrylamidového gelu pro SDS-PAGE - zařízení AE-6220 Dual Slab Chamber od společnosti ATTO corporation.

### Přenos proteinů na membránu (Western blot)

Před provedením imunodetekce byly proteiny rozdělené podle své molekulové hmotnosti s použitím SDS-PAGE přeneseny na PVDF (polyvinylidendifluorid) membránu Immobilon-P (Millipore), která byla předtím krátce smočena v methanolu a posléze v příslušném blotovacím pufru. Přenos proteinů byl proveden pomocí mokrého elektroblotu s použitím zařízení od firmy Labnet. V případě většího množství vzorků bylo výhodnější si připravit rozměrnější membránu a použít větší blotovací přístroj Trans-Blot<sup>®</sup> Cell (Bio-Rad). Přenos probíhal v blotovacím pufru 30 min při 360 mA.

### Imunodetekce proteinů

Za účelem zviditelnění proteinů s FLAG-epitopem jsme používali dvoukrokový imunodetekční postup, kdy se nejprve použije primární protilátka a následně sekundární protilátka, která je konjugovaná s reportérovým enzymem (v našem případě křenová peroxidáza). PVDF membrána (Millipore) s imobilizovanými proteiny byla blokována přes noc. Inkubace probíhala s primární králičí polyklonální protilátkou anti-FLAG (Sigma) a později s kozí sekundární polyklonální protilátkou anti-Rabbit konjugovanou s křenovou peroxidázou (Sigma). Pro vyvolání chemiluminiscenčního signálu byla použita komerční souprava SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) a vyvolávací kazeta

BAS MS2025 Imaging Plate (Fujifilm). Pro zachycení signálu byly použity rentgenové filmy. Za účelem kontroly rovnoměrného přenosu proteinů z polyakrylamidového gelu na PVDF membránu byla membrána obarvena roztokem amidové černě.

Během imunodetekce jsme dodržovali následující postup:

- 1) blokace imobilizovaných proteinů na membráně s použitím 5% BSA v TBS-T pufru přes noc
- 2) promytí 3 x 10 min v TBS-T pufru
- 3) inkubace s primární protilátkou (ředění 1:1000) v 1% BSA v TBS-T pufru po dobu 2 h
- 4) promytí 3 x 10 min v TBS-T pufru
- 5) inkubace se sekundární protilátkou (ředění 1:10000) v TBS-T pufru po dobu 1 h
- 6) promytí 3 x 10 min v TBS-T pufru
- 7) vyvolání signálu s použitím komerční soupravy (Pierce)
- 8) zachycení signálu na rentgenový film

### **4.2.3 Manipulace s *E. coli***

#### **Kultivace *E. coli***

Kultivace kultur *E. coli* probíhala v tekutém LB médiu za neustálého třepání, aby bylo zajištěno dostatečné okysličení. V případě kultivace na pevném médiu jsme použili LB médium s přídavkem 1,5% agaru. Kultura byla vždy inkubována při teplotě 37°C. Selektce buněk obsahujících žádaný plazmid byla zajištěna přídavkem příslušného antibiotika o odpovídající koncentraci.

#### **Izolace plazmidové DNA *E. coli***

Pokud jsme nepotřebovali vysokou čistotu plazmidové DNA, přistoupili jsme k izolaci DNA metodou alkalické lyze bez použití purifikačních kolonek. Vybranou kolonii *E. coli* jsme izolovali a následně její buňky inokulovali do 2 ml LB média s příslušným selekčním antibiotikem a kultivovali přes noc. Druhý den jsme narostlou kulturu centrifugovali a peletu jsme pečlivě resuspendovali ve 100 µl roztoku PEB I. Dále jsme přidali 200 µl roztoku II a několikrát promíchali překlápěním, přidali 150 µl roztoku III a nechali inkubovat 5 min na ledu. Poté jsme vzorky stočili 10 min při 16000 g a následně odebrali supernatant.



K supernatantu jsme přidali jeden objem izopropanolu. Sraženinu jsme centrifugovali (10 min, 16000 g) a vzniklou peletu obsahující vysráženou plazmidovou DNA a RNA jsme následně promyli pomocí 200  $\mu$ l 70% etanolu. Vzorek jsme sušili 5 min s použitím speedvacu, přidali 20  $\mu$ l TE pufru obsahující RNázu A a peletu resuspendovali, čímž došlo k odbourání RNA a vznikl roztok obsahující plazmidovou DNA.

Za účelem získání plazmidové DNA o vysoké čistotě jsme používali komerční soupravu QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (Qiagen) a postupovali podle návodu od výrobce.

Koncentrace DNA byla určena spektrofotometricky měřením absorbance v ultrafialové (UV) oblasti elektromagnetického spektra při vlnové délce 260 nm pomocí přístroje Du<sup>®</sup> 730 Life Sciences UV/VIS Spectrophotometer od společnosti Beckman Coulter<sup>®</sup>.

### **Příprava kompetentních buněk *E. coli***

Příprava kompetentních buněk *E. coli* DH5 $\alpha$  byla provedena podle postupu, který publikoval Inoue *et al.* (1990). 400  $\mu$ l kultury bakteriálních buněk, které narostly přes noc, jsme inokulovali do 100 ml půdy SOB a suspenzi následně kultivovali za stálého třepání při 18°C, dokud nebylo dosaženo hodnoty OD<sub>600</sub> = 0,6. Poté jsme kultivaci přerušili a bakteriální kulturu jsme ochladili 10 min na ledu. Pokračovali jsme centrifugací (2500 g, 4°C, 10min) a poté resuspendováním pelety buněk ve 32 ml ledového TB pufru. Buněčnou suspenzi jsme nechali stát 10 min na ledu a opět centrifugovali (2500 g, 4°C, 10min). Po resuspendování buněk v 8 ml TB pufru jsme přidali DMSO ve výsledné koncentraci 7 % a nechali inkubovat 10 min na ledu. Buněčnou suspenzi jsme následně rozdělili do mikrozkušavek po 100  $\mu$ l a poté zmrazili v kapalném dusíku. Připravené kompetentní buňky jsme uchovávali v hlubokomrazícím boxu při -80°C.

### **Transformace DNA do buněk *E. coli* plazmidovou DNA**

Ke 100  $\mu$ l kompetentních buněk jsme přidali 10  $\mu$ l ligační směsi a následně nechali inkubovat 30 min na ledu. Poté jsme buňky vystavili teplotě 42°C na 90 s, což způsobilo tepelný šok, a posléze je přesunuli na led na 90 s. Dalším krokem bylo přidání 400  $\mu$ l LB média a inkubace buněk při 37°C po dobu 1 h. Poté byla transformační směs nanášena na Petriho misky obsahující LB agar s přidavkem příslušného antibiotika a ty byly inkubovány přes noc při 37°C v termostatu.

#### **4.2.4 Manipulace se *S. pneumoniae***

##### **Kultivace *S. pneumoniae***

Kultivace kultur *S. pneumoniae* probíhala staticky v komplexních médiích C+Y nebo TSB při 37°C ve vodní lázni. Pokud jsme potřebovali indukovat expresi genů pod kontrolou indukibilního zinkového promotoru, byl do tekutého či pevného média přidáván  $\text{ZnCl}_2$  o různých koncentracích.

##### **Příprava konzerv *S. pneumoniae***

Příprava konzerv probíhala podle následujícího postupu: 200  $\mu\text{l}$  kultury *S. pneumoniae* ( $\text{OD}_{600} = 0,4$ ) jsme inokulovali do 10 ml média TSB nebo C+Y a ponechali narůst do  $\text{OD}_{600} = 0,4$ . Narostlou kulturu jsme následně rozdělili do mikrozkušavek po 750  $\mu\text{l}$  a přidali 250  $\mu\text{l}$  60% glycerolu, aby jeho výsledná koncentrace byla 15 %. Připravené konzervy jsme uložili ke skladování při -80°C. Pokud bylo třeba, byl do média přidáván  $\text{ZnCl}_2$  o koncentraci 0,1 mM.

##### **Izolace chromozomální DNA *S. pneumoniae***

K inokulaci 10 ml TSB média jsme použili 200  $\mu\text{l}$  kultury *S. pneumoniae* z konzervy a následně nechali inkubovat při 37°C až do  $\text{OD}_{600} = 0,5$ . Buňky byly sklizeny centrifugací (10 min, 4°C, 8000 g), promyty pomocí pufru (10 mM Tris-HCl; pH 7,5) a poté znovu stočeny (10 min, 4°C, 4060 g). Potom jsme přidali roztok SEDS, buňky resuspendovali a následně nechali inkubovat při 37°C dokud nezlyzovaly. K lyzátu jsme přidali proteinázu K (2 mg/ml) a suspenzi nechali inkubovat 15 min při 56°C. Poté jsme přidali 250  $\mu\text{l}$  TE pufru a pokračovali extrakcí pomocí směsi fenol-chloroform (poměr 1:1). Směs jsme odstředili (10 min, 4060 g) při laboratorní teplotě, odebrali horní (vodnou) fázi a v případě potřeby jsme zopakovali fenol-chloroformovou extrakci ještě jednou. Následně jsme vzorky extrahovali chloroformem. DNA byla vysrážena v přítomnosti 0,1 objemu 3 M NaOAc pH 4,8 a 0,6 objemu izopropanolu. Vzorky jsme centrifugovali (10 min, 4060 g) při laboratorní teplotě, vzniklou peletu chromozomální DNA promyli 80% etanolem. Chromozomální DNA jsme pak nechali rozpustit v TE pufru s RNázou (20  $\mu\text{g/ml}$ ) a změřili koncentraci chromozomální DNA spektrofotometricky při  $A_{260}$ . Čistota chromozomální DNA byla ověřena rovněž spektrofotometricky poměrem absorbancí  $A_{260/280}$ .

## **Indukce exprese GlmM-FLAG v *S. pneumoniae* s následnou izolací z bezbuněčných lyzátů**

Indukci exprese GlmM-FLAG jsme prováděli buď v 10 ml nebo 50 ml média TSB nebo C+Y. V případě objemu 10 ml jsme inokulovali 200  $\mu$ l kultury *S. pneumoniae* ( $OD_{600} = 0,4$ ) a v případě 50 ml 1 ml této kultury. Na počátku kultivace jsme do média přidávali různé koncentrace  $ZnCl_2$ , který indukuje expresi *glmM-FLAG*. Kultivace probíhala staticky při 37°C, dokud nebylo dosaženo hodnoty  $OD_{600} = 0,5$ . Potom jsme kulturu stočili 5 min při 7000 g a peletu resuspendovali v 20  $\mu$ l roztoku SEDS a následně suspenzi nechali inkubovat při 37°C (cca 10 min, záleží na kmeni), dokud buňky nezlyzovaly. Pak jsme přidali 2x SDS vzorkový pufr a vzorek inkubovali 10 min při 100°C, nechali chvíli na stole vychladnout a uložili do -20°C nebo jsme rovnou vzorky nanесли na SDS-PAGE.

## **Transformace buněk *S. pneumoniae***

Zde popsaná metoda je založena na navození stavu kompetence přidavkem synteticky připraveného kompetenčního feromonu CSP (Competence Stimulating Peptide). Nejprve jsme připravili médium pro transformaci tak, že do 10 ml TSB média jsme přidali 100  $\mu$ l  $CaCl_2$ , 250  $\mu$ l 8% BSA a pH upravili na hodnotu 8 pomocí 1M NaOH a nechali stát 5 min ve vodní lázni při 37°C. Poté jsme k 950  $\mu$ l vytemperovaného média přidali 50  $\mu$ l kultury *S. pneumoniae* ( $OD_{600} = 0,4$ ) a dále 250 ng CSP a templátovou DNA určenou k transformaci - 1  $\mu$ g chromozomální DNA nebo 50 ng PCR produktu či plazmidové DNA. Tuto transformační směs jsme nechali inkubovat staticky po dobu 2,5 h při 37°C. Předem jsme si připravili gelózu, která musí být zahřáta na 50°C a při této teplotě udržována, aby byla v tekutém stavu. Po 2,5h inkubaci jsme kulturu naředili. Ředění  $0-10^{-3}$  jsme vyseli na misky a zalili gelózou obsahující příslušné antibiotikum a zbývající ředění  $10^{-4}-10^{-5}$  jsme vyseli na dvě další misky a zalili gelózou bez antibiotika. Pokud bylo třeba, přidávali jsme do gelózy  $ZnCl_2$  o různých koncentracích. Jako pozitivní kontrola byla použita chromozomální DNA z kmene Sp5 kódující gen pro rezistenci k rifampicinu. V tomto případě jsme vyseli ředění  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$  a zalili gelózou obsahující rifampicin a suspenze z ředění  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  jsme zalili gelózou bez antibiotika. Transformační účinnost byla vypočítána na základě poměru získaných transformantů na miskách s antibiotikem oproti všem narostlým koloniím na miskách bez antibiotika.

#### **4.2.5 Mikroskopie**

Buňky *S. pneumoniae* byly pozorovány na inverzním fluorescenčním mikroskopu Olympus IX81. Používali jsme olejový imerzní objektiv 100x O2PH-UPLFLN/1.3 N.A. Oil. Během mikroskopování byl obraz snímán kamerou Olympus FV2T Digital B/W Fireware zpracován programem Cell<sup>R</sup> v. 2.0.

Mikroskopii jsme používali pro analýzu morfologie, kdy byl alikvot kultury (2 µl) *S. pneumoniae* rostoucí v C+Y médiu odebírán pro přípravu preparátu ve vybraných časových bodech během kultivace a okamžitě mikroskopován metodou fázového kontrastu.

Mikroskopii jsme dále používali pro analýzu výsledku Live/Dead barvení buněk (viz kap. 4.2.6), což umožnilo různé nastavování filtrů pro fluorescenci. Preparáty byly v obou případech mikroskopování připravovány tak, že jsme na krycí sklíčko přidali 2 µl buněčné suspenze a přiložili tenký bloček agarózy. Preparát jsme následně zafixovali v mikroskopovací komůrce a posléze analyzovali v mikroskopu.

#### **4.2.6 Live/Dead barvení**

Tato metoda slouží k rychlému rozlišení živých a mrtvých bakteriálních buněk ve vzorku pomocí barvicí techniky založené na fluorescenční analýze dvou barviv. Ze vzorku kultury se odebere alikvot, z něhož se podle níže popsaného postupu připraví preparát, který se posléze podrobí analýze na fluorescenčním mikroskopu. Princip metody spočívá v použití směsi dvou odlišných barviv v daném poměru, které se vyznačují rozdílnou spektrální charakteristikou a různou schopností proniknout do nepoškozených živých buněk. Přidává se 1) Syto9 – zelené fluorescenční barvivo nukleových kyselin s excitačním maximem při 480 nm a emisním při 500 nm a 2) PI (propidium jodid) – červené fluorescenční barvivo nukleových kyselin s excitačním maximem při 490 nm a emisním při 635 nm. Samotné barvivo Syto9 obvykle označí veškeré bakterie ve vzorku, tedy jak buňky nepoškozené tak i buňky s narušenou membránou. PI naopak proniká pouze do bakterií s poškozenou membránou a jakmile se dostane do kontaktu se Syto9, způsobí snížení jeho fluorescence. Živé bakterie s neporušenou buněčnou membránou jsou tudíž ve fluorescenčním mikroskopu zelené (filtr GFP), zatímco mrtvé bakterie s poškozenou membránou červené (filtr Texas Red).

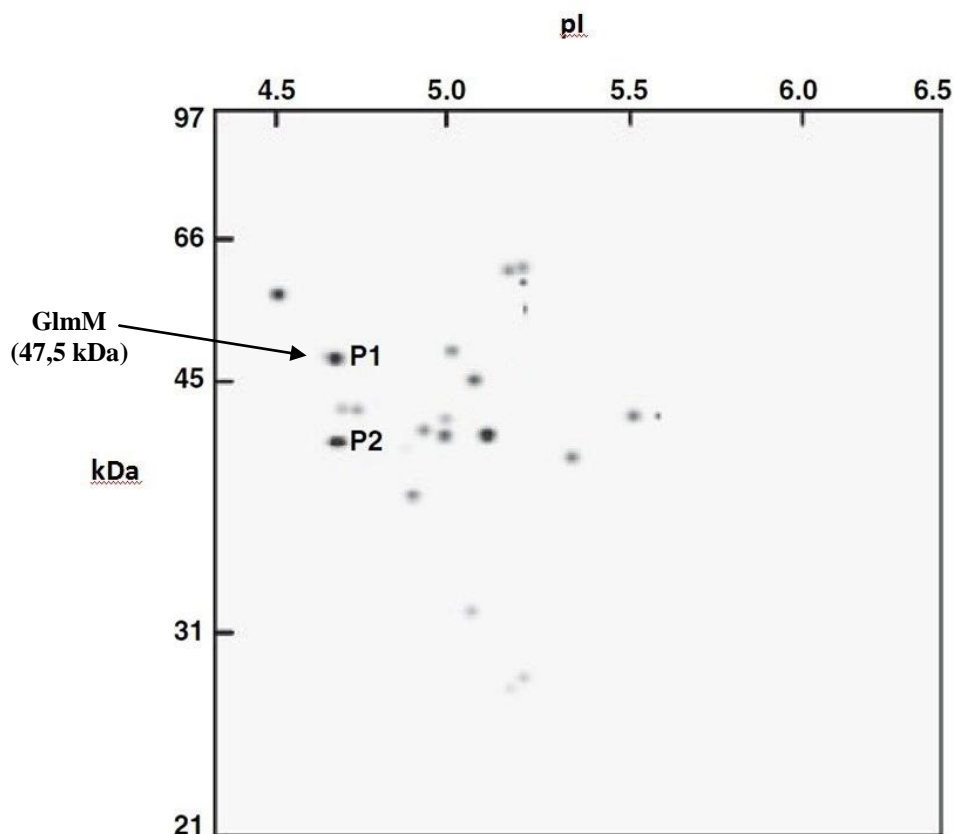
Tato barvicí metoda byla provedena s použitím komerční soupravy Live/Dead<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kits (Invitrogen) podle následujícího postupu:

- 1) naředit bakteriální kulturu na hodnotu odpovídající  $OD_{600} = 0,3/\text{ml}$
- 2) odstředit 1 ml kultury při 3380 g 1,5 min
- 3) promýt přidáním 1 ml 0,85% NaCl předem temperovaného na 37°C
- 4) odstředit při 3380 g 1 min
- 5) peletu resuspendovat v celkovém objemu 10  $\mu\text{l}$ : smíchat 5  $\mu\text{l}$  0,85% NaCl s 5  $\mu\text{l}$  připravené směsi barviv PI / Syto9 v poměru 1:1 (výsledná koncentrace: 5  $\mu\text{M}$  Syto9 a 30  $\mu\text{M}$  PI)
- 6) zabalit mikrozkušavku do hliníkové fólie a inkubovat po dobu maximálně 1 h na stole pro intenzivní zbarvení buněk
- 7) promýt přidáním 1 ml 0,85% NaCl a odstředit při 3380 g 1 min
- 8) odebrat supernatant a promýt pelet 1x se 100  $\mu\text{l}$  0,85% NaCl a odstředit při 3380 g 1 min
- 9) peletu resuspendovat v 50  $\mu\text{l}$  0,85% NaCl a následně odebrat 2  $\mu\text{l}$  na mikroskopování

S použitím fluorescenčního mikroskopu (viz kap. 4.2.5 Mikroskopie) jsme vzorky nejprve pozorovali v režimu fázového kontrastu a následně postupně nastavovali filtry pro vizualizaci fluorescenčního signálu GFP (barvivo Syto9) a Texas Red (barvivo PI).

## 5. Výsledky

Porovnání fosfoproteomových map cytoplazmatických frakcí divokého kmene *S. pneumoniae* a kmene *S. pneumoniae*  $\Delta$ stkP odhalilo dva potenciální substráty eSTK StkP *in vivo* reprezentované skvrnami P1 a P2 (Obr. 5.1), které se ve fosfoproteomové mapě uvedeného mutantního kmene neobjevily. Na základě analýzy fosfoproteinových skvrn P1 a P2 prostřednictvím metody hmotnostní spektrometrie byla P1 identifikována jako fosfoglukozaminmutáza (GlmM) a P2 jako alfa podjednotka RNA polymerázy (Nováková *et al.*, 2005). V případě fosfoproteinové skvrny P2 se později ukázalo, že se jednalo o artefakt způsobený stejnou pohyblivostí alfa podjednotky RNA polymerázy (RpoA) a proteinu DivIVA (Nováková *et al.*, 2010).



**Obr. 5.1:** Fosfoproteomová mapa získaná pomocí dvojrozměrné gelové elektroforézy. Na mapě jsou označeny dvě fosfoproteinové skvrny (P1 a P2), které byly posléze identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Horní vodorovná osa označuje rozsah pH, svislá osa vlevo označuje molekulovou hmotnost v jednotkách kDa pomocí vyznačených pozic proteinových standardů. Stupnice pH horní vodorovné osy umožňuje odečíst izoelektrický bod (pI) fosfoproteinu. Skvrna P1 byla identifikována jako fosfoglukozaminmutáza (GlmM) *S. pneumoniae*, jejíž molekulová hmotnost činí cca 47,5 kDa. Převzato z (Nováková *et al.*, 2005).

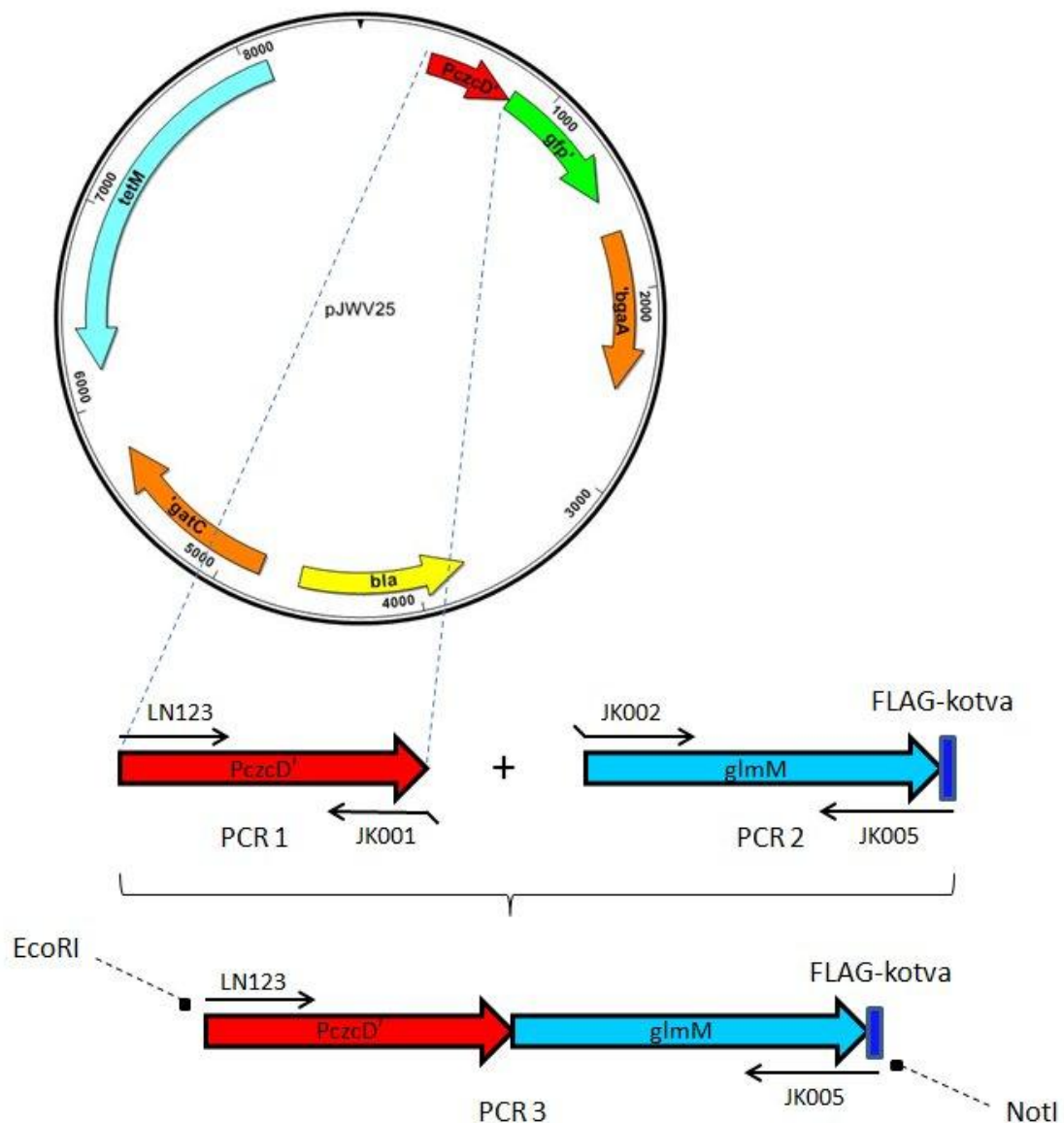
## 5.1 Příprava merodiploidního kmene *S. pneumoniae*

Abychom mohli zjistit, zda je gen *glmM* kódující enzym GlmM pro životaschopnost *S. pneumoniae* esenciální, bylo třeba připravit merodiploidní kmen obsahující dvě kopie genu *glmM* - nativní gen exprimovaný konstitutivně a jeho ektopickou kopii pod kontrolou zinkového promotoru.

### 5.1.2 Příprava vektoru

Napřed bylo nezbytné připravit vektor, který by umožnil vložit do chromozomu *S. pneumoniae* ektopickou kopii genu *glmM* pod kontrolou inducibilního promotoru. K tomuto účelu jsme si vybrali plazmidový vektor pJWV25 (Eberhardt *et al.*, 2009), který byl původně navržen za účelem exprese proteinů fúzovaných s GFP (zelený fluorescenční protein) ve *S. pneumoniae*, ale je též vhodný pro fúzi genu *glmM* s inducibilním zinkovým promotorem  $P_{czcD}$ . Výhodou tohoto plazmidu je skutečnost, že již obsahuje dvojici sekvencí *gatC* a *bgaA*, které díky homologii umožňují stabilní vložení konstruktů do neesenciálního *bgaA* lokusu na chromozomu *S. pneumoniae*. Pro zajištění selekce klonů slouží gen *tetR* kódující rezistenci k tetracyklinu.

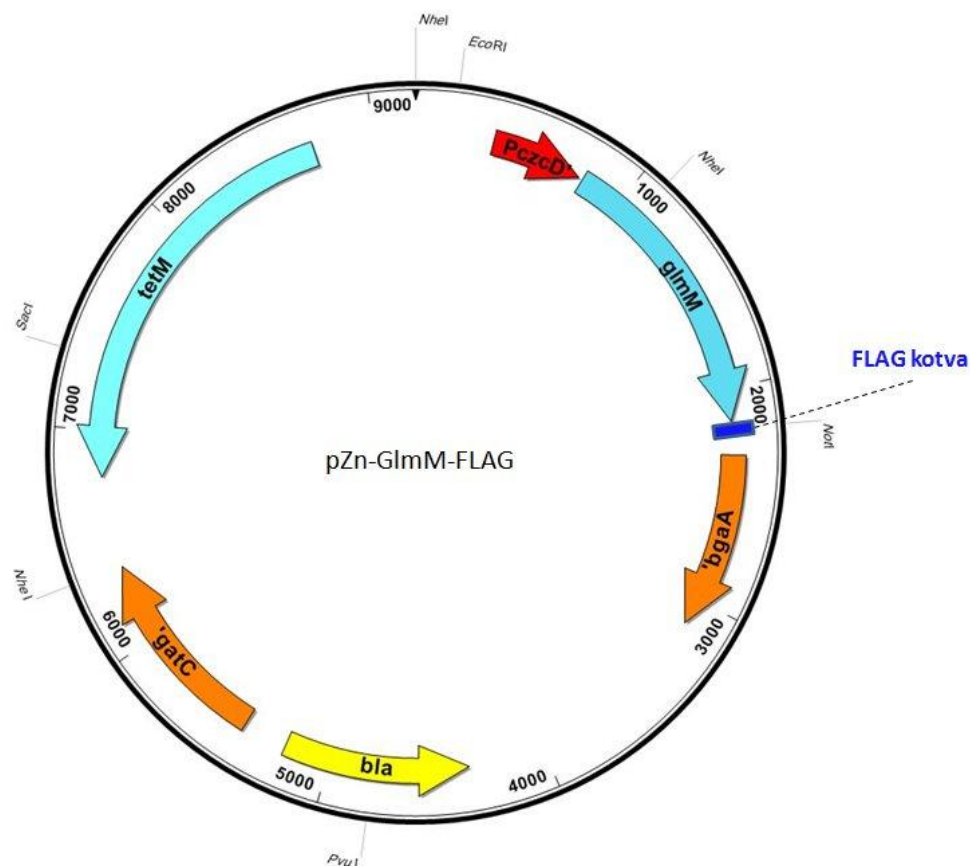
Při přípravě vektoru bylo prvním krokem vytvoření fúzního konstruktů  $P_{czcD}$ -*glmM*-FLAG (viz Materiál a metodika kap. 4.2.1) sestávajícího ze dvou fragmentů, k jejichž spojení jsme použili metodu fuzní PCR (Obr. 5.2), kdy jsme nejprve amplifikovali oba fragmenty zvlášť pomocí oligonukleotidů, které do nich zavedly přesahující vzájemně komplementární konce, prostřednictvím nichž se oba fragmenty v další PCR reakci spojily za vzniku fúzního konstruktů. Gen *glmM* byl amplifikován z plazmidu pTrcHis60 (na Obr. 5.2 není zobrazen), přičemž na C-konec *glmM* byla pomocí oligonukleotidu JK005 zavedena sekvence pro FLAG-epitop, který později umožnil imunodetekci proteinu GlmM. Fúzní konstrukt  $P_{czcD}$ -*glmM*-FLAG jsme do plazmidu pJWV25 klonovali pomocí restrikčních míst rozeznávaných restrikčními endonukleázami *EcoRI* a *NotI* za vzniku plazmidového vektoru o velikosti 9193 pb, který jsme nazvali **pZn-GlmM-FLAG** (Obr. 5.3). Správnou velikost vektoru jsme ověřili kontrolním štěpením pomocí restrikčních endonukleáz *SacI* a *NheI*. Připravený vektor obsahuje jediné restrikční místo *SacI* a tři místa *NheI*. Na základě analýzy elektroforetogramu (Obr. 5.4) jsme zjistili, že je velikost vektoru odpovídající.



**Obr. 5.2: Schéma fuzní PCR - příprava konstruktů  $P_{czcD}$ - $glmM$ -FLAG**

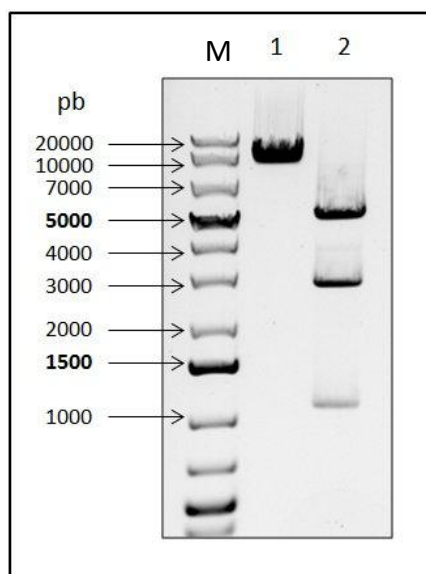
$P_{czcD}$ : inducibilní zinkový promotor; *gfp*: gen kódující GFP; *glmM*: gen kódující enzym GlmM; *bgaA* a *gatC*: oblasti umožňující homologní rekombinaci vektoru do chromozomu *S. pneumoniae*; *tetM*: gen pro rezistenci k tetracyklinu; *bla*: gen pro rezistenci k ampicilinu; **FLAG-kotva**: sekvence kódující FLAG-kotvu/epitop; *EcoRI*, *NotI*: použité restriční endonukleázy; LN123, JK001, JK002, JK005: použité oligonukleotidy





**Obr. 5.3: Mapa vektoru pZn-GlmM-FLAG**

**P<sub>czcD</sub>**: inducibilní zinkový promotor; **glmM**: gen kódující enzym GlmM; **bgaA** a **gatC**: oblasti umožňující homologní rekombinaci vektoru do chromozomu *S. pneumoniae*; **tetM**: gen pro rezistenci k tetracyklinu; **bla**: gen pro rezistenci k ampicilinu; **FLAG-kotva**: sekvence kódující FLAG-kotvu/epitop; **EcoRI**, **NotI**, **PvuI**: použitá restrikční místa pro přípravu vektoru pZn-GlmM-FLAG; **NheI**, **SacI**: použitá restrikční místa pro ověření správné délky připraveného vektoru

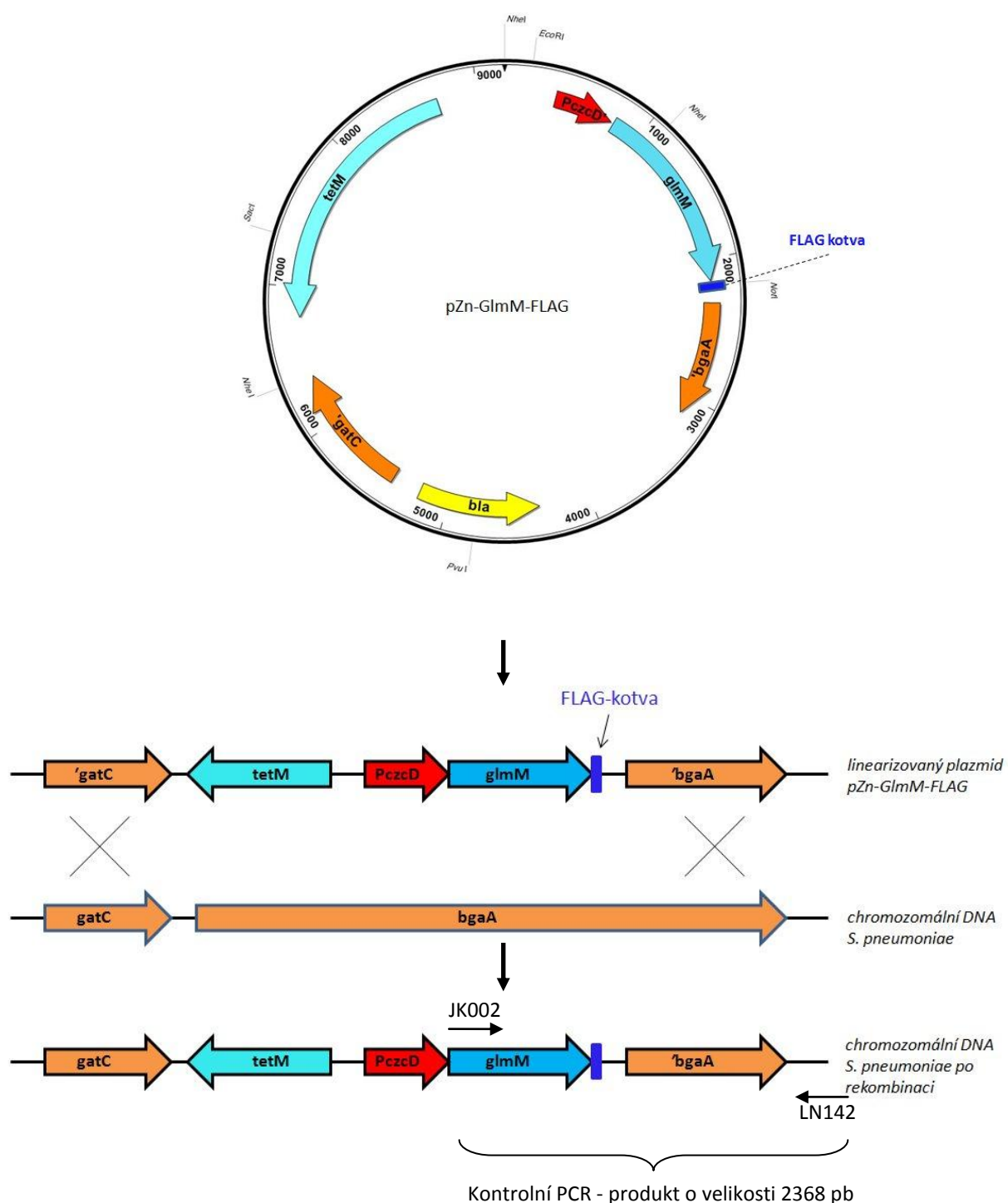


**Obr. 5.4: Kontrolní štěpení plazmidového vektoru pZn-GlmM-FLAG**

- 1) linearizovaný plazmid o délce 9193 pb po štěpení restrikční endonukleázou *SacI*  
 2) tři fragmenty o délkách 1101, 2835 a 5257 pb vzniklé po štěpení restrikční endonukleázou *NheI*  
 M - standard molekulových hmotností 1 kb

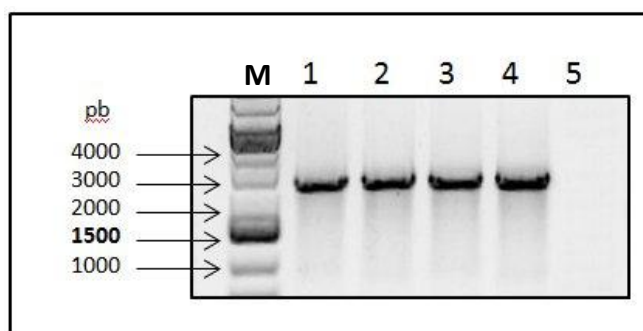
### 5.1.3 Transformace vektoru do chromozomu *S. pneumoniae*

Připravený vektor **pZn-GlmM-FLAG** jsme linearizovali pomocí restrikční endonukleázy *PvuI* (Obr. 5.5) a poté jej použili pro transformaci kmenů *S. pneumoniae* Sp1 a Sp225 za vzniku merodiploidních kmenů **Sp217** (Sp1 *bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG*) a **Sp245** (Sp225 *bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG*). Vzniklé merodiploidní kmeny Sp217 a Sp245 obsahují kromě nativního genu *glmM* také jeho ektopickou kopii, jejíž exprese podléhá kontrole inducibilního zinkového promotoru *P<sub>czcD</sub>*. Transformanty vyrostly na miskách s tetracyklinem jako selekčním antibiotikem. K ověření správného vložení konstruktu *P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG* do *bgaA* lokusu na chromozomu *S. pneumoniae* jsme použili PCR (Obr. 5.5) s oligonukleotidem JK002, který je komplementární k části vložené sekvence, a LN142, který je komplementární k části sekvence na chromozomu *S. pneumoniae* nacházející se mimo rekombinovanou oblast. Za účelem negativní kontroly jsme použili jako templát chromozomální DNA kmene divokého typu Sp1. Na základě analýzy elektroforetogramu (Obr. 5.6) jsme zjistili, že vložení konstruktu proběhlo správně.



**Obr. 5.5:** Schéma integrace části konstruktu pZn-GlmM-FLAG do chromozomu *S. pneumoniae* kmenů Sp1 a Sp225

**P<sub>czcD</sub>:** inducibilní zinkový promotor; **glmM:** gen kódující enzym GlmM; **bgaA** a **gatC:** oblasti umožňující homologní rekombinaci vektoru do chromozomu *S. pneumoniae*; **tetM:** gen pro rezistenci k tetracyklinu; **bla:** gen pro rezistenci k ampicilinu; **FLAG-kotva:** sekvence kódující FLAG-kotvu/epitop; **PvuI:** restrikční místo použité pro linearizaci vektoru; **JK002, LN142:** oligonukleotidy použité v kontrolní PCR reakci



**Obr. 5.6:** Elektroforetogram kontrolní PCR - ověření integrace konstruktů *P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG* do chromozomu *S. pneumoniae*

**1-2)** Kmen Sp217 (*Sp1 bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG*) klony 1-2 - vznikl produkt o předpokládané velikosti 2368 pb

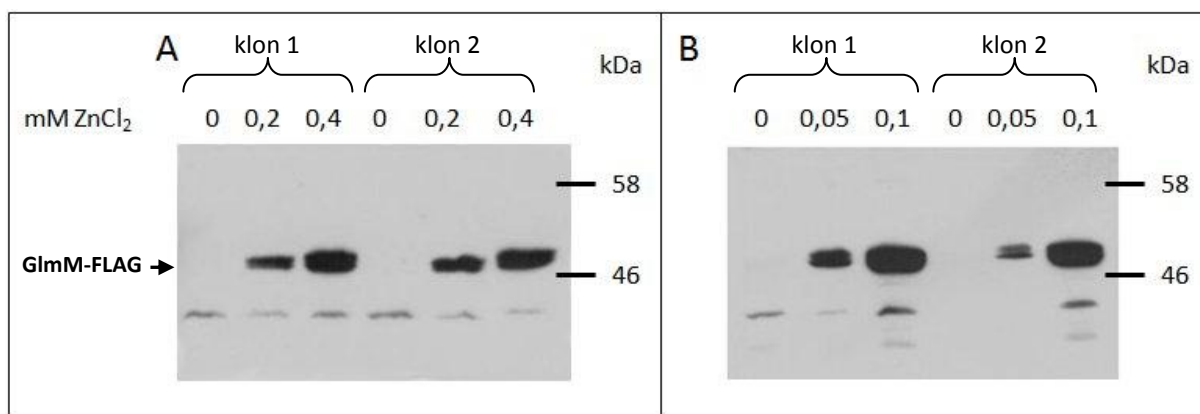
**3-4)** Kmen Sp245 (*Sp225 bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG*) klony 1-2 - vznikl produkt o předpokládané velikosti 2368 pb

**5)** Kmen Sp1 (WT) - nevznikl žádný produkt, neboť v tomto kmeni není vložena sekvence konstruktů (negativní kontrola)

**M** - standard molekulových hmotností 1 kb

#### 5.1.4 Testování exprese proteinu *GlmM-FLAG* pod zinkovým promotorem

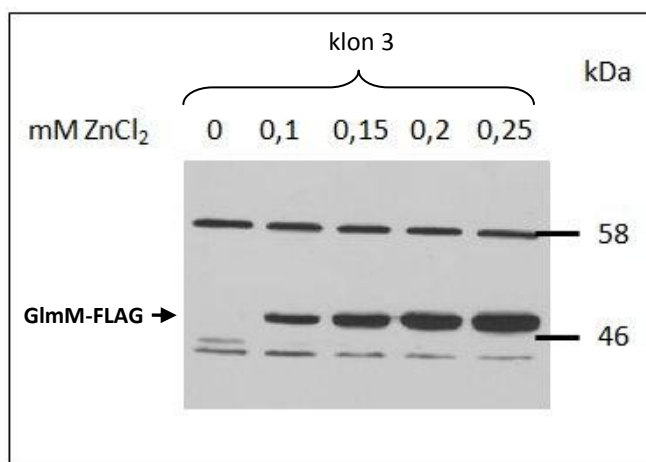
U vytvořených kmenů *S. pneumoniae* Sp217 (*Sp1 bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG*) a Sp245 (*Sp225 bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG*) jsme testovali expresi proteinu GlmM pod kontrolou inducibilního zinkového promotoru *P<sub>czcD</sub>* v TSB a v C+Y médiu v přítomnosti různých koncentrací  $\text{ZnCl}_2$  (Obr 5.7-8), induktoru exprese genu *glmM*. V lyzátech obou kmenů (Sp217 a Sp245) jsme dvoukrokovou imunodetekcí s použitím primární králičí protilátky proti FLAG-epitopu (anti-FLAG) a následně sekundární protilátky anti-Rabbit konjugované s křenovou peroxidázou detekovali protein, který odpovídal velikosti proteinu GlmM-FLAG (47,5 kDa) (Obr. 5.7-8). Z obrázků je jasné patrné, že signál se zvyšuje se stoupající koncentrací  $\text{ZnCl}_2$  v médiu, zatímco při 0 mM  $\text{ZnCl}_2$  nebyl detekován. V lyzátech obou testovaných kmenů se vyskytly i jiné proteiny, které reagovaly s anti-FLAG protilátkou. Tyto signály však byly velmi slabé a pravděpodobně se jednalo o nespecifické reakce. U kmene Sp245 jsme po předchozích testech exprese a následných imunodetekcích zjistili, že je třeba použít vyšší koncentrace  $\text{ZnCl}_2$  než u kmene Sp217. V TSB médiu jsme expresi GlmM-FLAG u kmene Sp245 netestovali z níže zmíněných důvodů uvedených v dalším odstavci této kapitoly.



**Obr. 5.7: Imunodetekce proteinu GlmM-FLAG (47,5 kDa), jehož exprese je indukována různými koncentracemi  $\text{ZnCl}_2$ , pomocí anti-FLAG protilátky ve kmeni Sp217 ( $\text{Sp1 } bgaA::P_{czcD}\text{-glmM-FLAG}$ )**

**A)** v TSB médiu

**B)** v C+Y médiu



**Obr. 5.8: Imunodetekce proteinu GlmM-FLAG (47,5 kDa), jehož exprese je indukována různými koncentracemi  $\text{ZnCl}_2$  v C+Y médiu, pomocí anti-FLAG protilátky ve kmeni Sp245 ( $\text{Sp225 } bgaA::P_{czcD}\text{-glmM-FLAG}$ )**

Z výsledků tohoto testování vyplývá, že exprese GlmM-FLAG pod kontrolou  $P_{czcD}$  je striktně závislá na koncentraci přidaného  $\text{ZnCl}_2$  do média a dochází ke specifické indukci exprese genu *glmM-FLAG* v obou testovaných médiích. Přestože z předchozích zkušeností víme, že kmeny odvozené od kmene divokého typu Sp1 (Rx derivát) vykazují při kultivaci v TSB médiu reprezentativní morfolonii, zvolili jsme pro další experimenty týkající se tohoto diplomového projektu C+Y médium, a to i přes to, že z hlediska vlivu na morfolonii buněk není zcela ideální. Ve srovnání s TSB médiem představuje C+Y médium definovanější médium a koncentrace  $\text{ZnCl}_2$  v C+Y médiu je tedy snadněji kontrolovatelná, což je pro studium esenciality genu *glmM* zásadní. Jelikož kmen *S. pneumoniae* divokého typu

Sp225 (R6) vykazuje při kultivaci v C+Y médiu správnou morfologii, dodatečně jsme jej zvolili jako druhý výchozí kmen divokého typu pro naše experimenty. Z časových důvodů jsme je však nestihli provést.

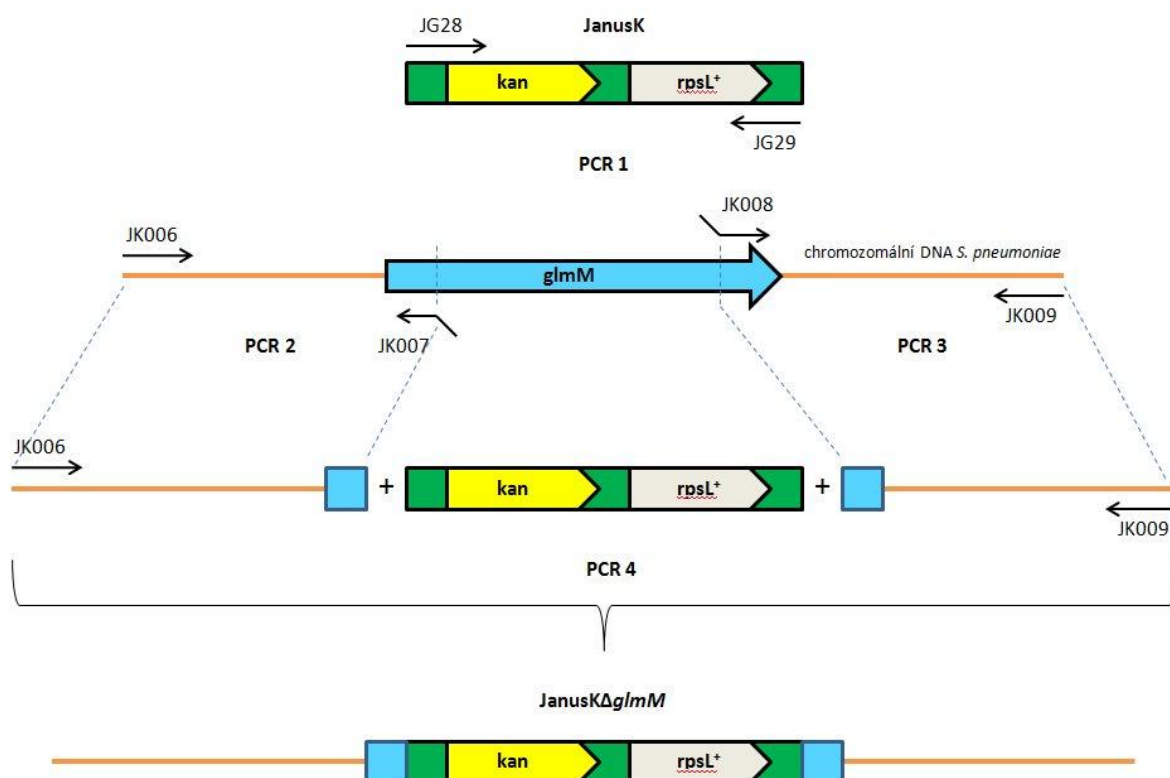
## **5.2 Příprava mutantního kmene *S. pneumoniae* $\Delta glmM/bgaA::P_{czcD}-glmM-FLAG$**

Abychom mohli dále analyzovat, zda je GlmM esenciální pro životaschopnost *S. pneumoniae*, bylo v návaznosti na vytvoření merodiploidního kmene (viz kap. 5.1) nutné provést v tomto kmeni delecí nativního genu *glmM* a tento nově získaný kmen dále charakterizovat.

### **5.2.1 Příprava konstruktů pro delecí nativního genu *glmM* *S. pneumoniae***

Nativní gen *glmM* *S. pneumoniae* se nachází uprostřed shluku genů kódujících hypotetické proteiny ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). K provedení delecí *glmM* jsme zvolili Janus kazetu (Sung *et al.*, 2001), která představuje lineární DNA konstrukt o délce 1333 pb nesoucí gen *kan* kódující rezistenci ke kanamycinu a dále dominantní alelu genu *rpsL*, která uděluje senzitivitu ke streptomycinu. Gen *rpsL* kóduje jeden z proteinů S malé ribozomální podjednotky (Salles *et al.*, 1992). Zavedení dominantní alely *rpsL*<sup>+</sup> prostřednictvím Janus kazety (JanusK) je pro přípravu mutantního kmene *S. pneumoniae* transformací podle Sung *et al.* (2001) nezbytné, protože použité kmeny Sp217 a Sp245 jsou ke streptomycinu rezistentní, neboť nesou recesivní alelu genu *rpsL*.

Aby bylo možné JanusK integrovat do určeného místa na chromozomu *S. pneumoniae* a provést tak delecí nativního genu *glmM*, bylo potřeba vytvořit konstrukt (viz Materiál a metodika kap. 4.2.1), který kromě JanusK uprostřed obsahuje po obou stranách dvě oblasti, které jsou homologní k oblastem obklopujícím nativní gen *glmM*. To umožňuje integraci konstruktů prostřednictvím homologní rekombinace. S použitím PCR jsme tedy napřed amplifikovali všechny tři fragmenty zvlášť - JanusK a obě homologní oblasti, které jsme následně spojili pomocí fuzní PCR (Obr. 5.9) za vzniku lineárního konstruktů o délce 3619 pb, který jsme nazvali **JanusK $\Delta glmM$** .

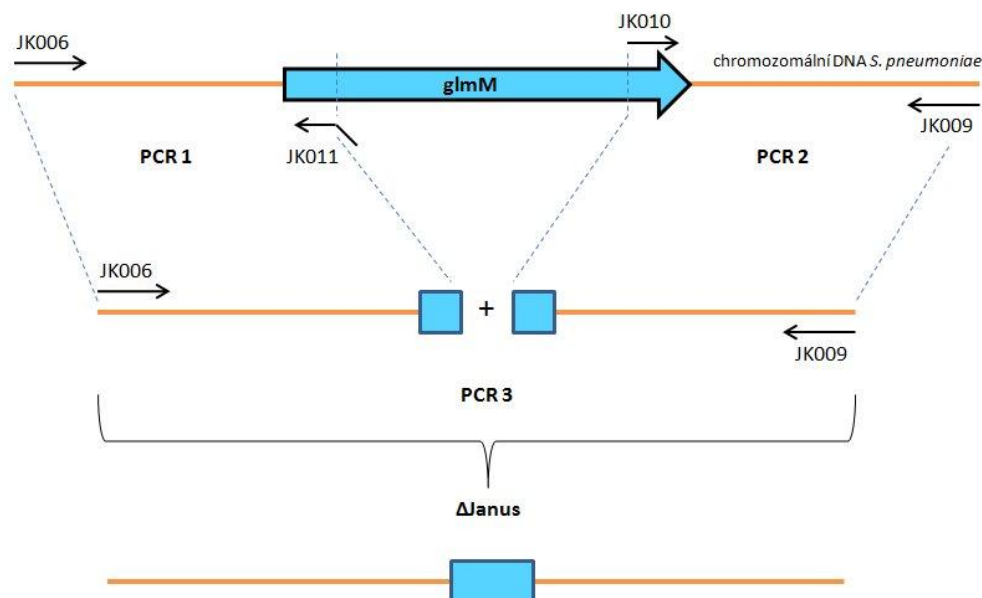


**Obr. 5.9:** Schéma vytvoření konstrukt *JanusKΔglmM* pomocí fuzní PCR

**JanusK:** Janus kazeta obsahující geny *kan* a *rpsL<sup>+</sup>*; ***kan*:** gen kódující rezistenci ke kanamycinu; ***rpsL<sup>+</sup>*:** dominantní alela genu *rpsL* udělující senzitivitu ke streptomycinu; ***glmM*:** gen kódující fosfoglukozaminmutázu *S. pneumoniae*; **JG28 a JG29:** použité oligonukleotidy pro amplifikaci *JanusK* v reakci PCR 1; **JK006 a JK007:** použité oligonukleotidy v reakci PCR 2 pro amplifikaci oblasti o délce 1142 pb; **JK008, JK009:** použité oligonukleotidy v reakci PCR 3 pro amplifikaci oblasti o délce 1144 pb; **JK006 a JK009:** nukleotidy použité ve fuzní reakci PCR 4 vedoucí ke vzniku konstrukt *JanusΔglmM*

### 5.2.2 Příprava konstrukt pro delecí *Janus* kazety vložené na chromozomu *S. pneumoniae*

Paralelně s konstruktem *JanusKΔglmM* jsme připravovali fuzní konstrukt sestávající ze dvou fragmentů (Obr. 5.10 a kap. Materiál a metodika 4.2.1), které představují homologní části zmíněné v předchozí kapitole (viz kap. 5.2.1). Tento konstrukt jsme nazvali **ΔJanus** a byl určený k delecí vložené *JanusK* v místě, kde se původně nacházel nativní gen *glmM* na chromozomu *S. pneumoniae*. Tím by vznikl neznačený mutantní kmen. Z časových důvodů se však přípravu neznačeného mutantního kmene nepodařilo uskutečnit.



**Obr. 5.10:** Schéma vytvoření konstruktů  $\Delta$ Janus pomocí fuzní PCR

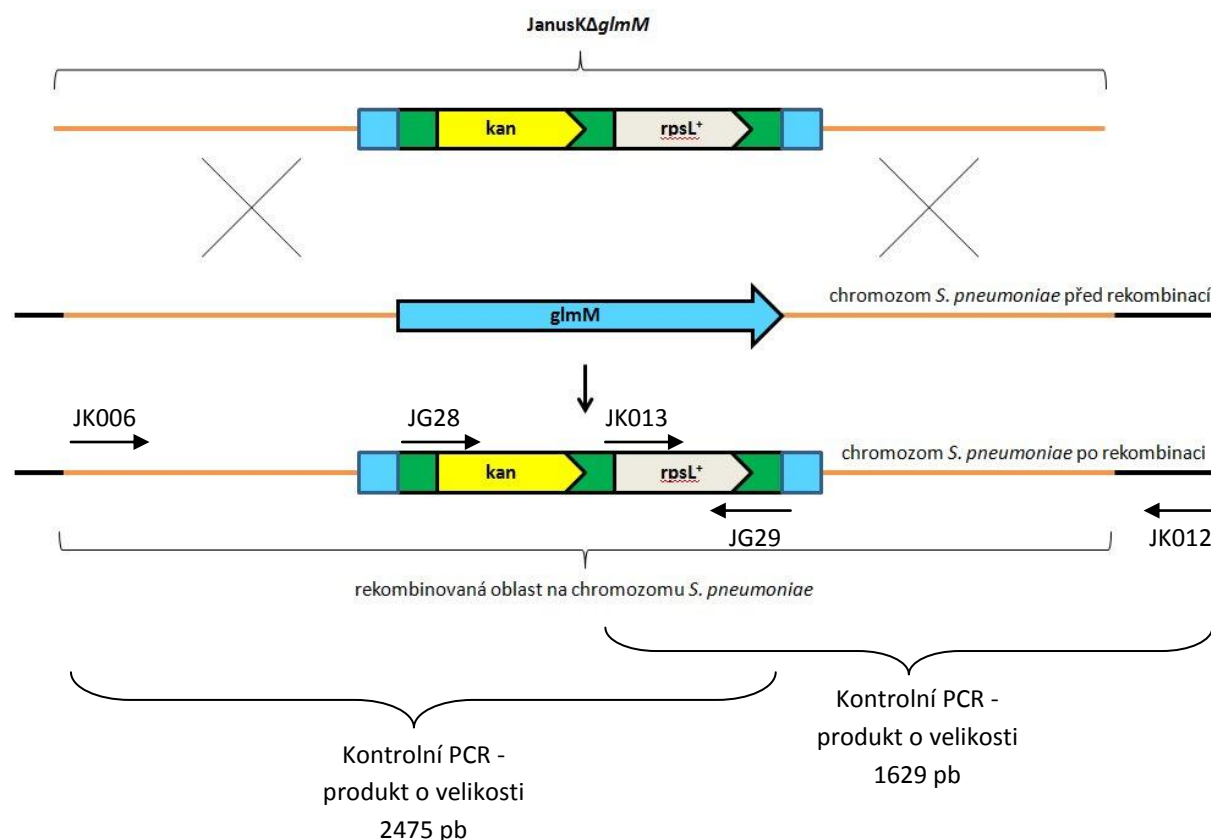
*glmM*: gen kódující fosfoglukozaminmutázu *S. pneumoniae*; **JK006** a **JK011**: oligonukleotidy použité v reakci PCR 1 pro amplifikaci oblasti o délce 1142 pb; **JK010** a **JK009**: oligonukleotidy použité v reakci PCR 2 pro amplifikaci oblasti o délce 1144 pb; **JK006** a **JK009**: oligonukleotidy použité ve fuzní reakci PCR 3 vedoucí ke vzniku konstruktů  $\Delta$ Janus

### 5.2.3 Transformace konstruktů pro delecí nativního genu *glmM* *S. pneumoniae*

Konstrukt **JanusK $\Delta$ glmM** jsme transformovali do merodiploidních kmenů Sp217 (Sp1 *bgaA*::P<sub>czcD</sub>-*glmM*-FLAG) a Sp245 (Sp225 *bgaA*::P<sub>czcD</sub>-*glmM*-FLAG) a také do kmenů divokého typu (WT) Sp1 a Sp225. Oba merodiploidní kmeny byly transformovány v TSB médiu, přičemž do gelózy byl přidán ZnCl<sub>2</sub> o koncentracích 0; 0,05 a 0,1 mM. K transformaci obou divokých kmenů bylo použito také TSB médium, avšak ZnCl<sub>2</sub> jsme do gelózy pochopitelně nepřidali. Transformační účinnost u kmenů Sp217 a Sp245 (Obr. 5.12) závisí na koncentraci ZnCl<sub>2</sub> v gelóze, přičemž u kmene Sp217 byla při koncentraci 0 mM ZnCl<sub>2</sub> téměř nulová a se zvyšující se koncentrací rostla, u kmene Sp245 byla nulová při 0 mM i 0,05 mM ZnCl<sub>2</sub>. Zaznamenali jsme tedy rozdílný požadavek na koncentraci ZnCl<sub>2</sub> v závislosti na kmeni. V případě kmenů *S. pneumoniae* WT Sp1 a Sp225 nebyly opakované transformace konstruktem **JanusK $\Delta$ glmM** úspěšné (Tab. 5.1) a žádné transformanty jsme nezískali ani po prodloužené 48 h inkubaci ve 37°C.



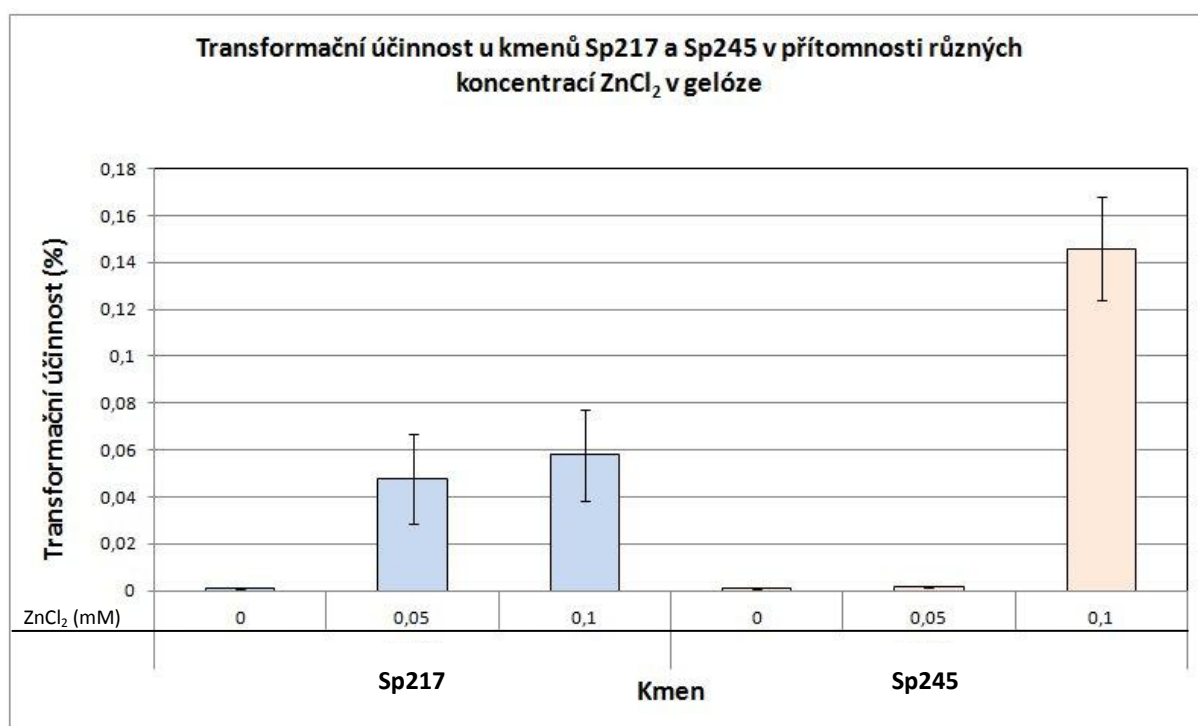
Konstrukt **JanusK $\Delta$ glmM** byl navržen tak, aby došlo k záměně nativního genu *glmM* za JanusK fúzovanou s oběma krátkými okraji genu *glmM*. Tato záměna je umožněna pomocí okrajových oblastí tohoto konstruktu prostřednictvím homologní rekombinace (Obr. 5.11). Jelikož JanusK obsahuje geny *kan* a *rpsL*<sup>+</sup>, tak v případě správného průběhu rekombinace je získaný kmen rezistentní ke kanamycinu a zároveň senzitivní ke streptomycinu. Pokračovali jsme tedy podle postupu Sung *et al.* (2001) založeném na dvoukrokové negativní selekci, kdy jsme narostlé transformanty první den přenesli na krevní misku s kanamycinem, ponechali inkubovat přes noc ve 37°C a druhý den je přenesli na misky s kanamycinem a streptomycinem a opět nechali inkubovat přes noc ve 37°C. Kolonie pocházející z buněk, u nichž transformace proběhla správně, narostly na kanamycinu, ale na streptomycinu nikoli.



**Obr. 5.11:** Schéma delece nativního genu *glmM* na chromozomu *S. pneumoniae* pomocí lineárního konstrukt **JanusK $\Delta$ glmM**

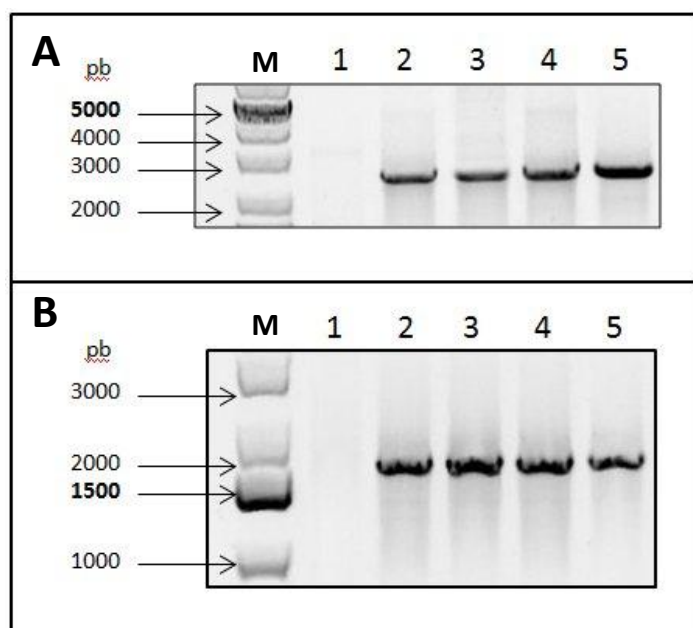
*kan*: gen kódující rezistenci ke kanamycinu; *rpsL*<sup>+</sup>: dominantní alela genu *rpsL* udělující senzitivitu ke streptomycinu; *glmM*: gen kódující fosfoglukozaminmutázu *S. pneumoniae*; **JG28**, **JG29**, **JK006**, **JK012**, **JK013**: oligonukleotidy použité v kontrolních PCR reakcích

Získali jsme mutantní kmeny s delecí nativního genu *glmM* - **Sp261** (Sp1  $\Delta glmM::janus/bgaA::P_{czcD}-glmM-FLAG$ ) a **Sp263** (Sp225  $\Delta glmM::janus/bgaA::P_{czcD}-glmM-FLAG$ ) (Tab. 5.1). Správnou integraci konstruktů JanusK $\Delta glmM$  do chromozomu *S. pneumoniae* jsme ověřili pomocí dvou reakcí PCR (Obr. 5.11). V první reakci jsme použili oligonukleotidy JK006 a JG29 za vzniku produktu o očekávané velikosti 2475 pb. Ve druhé reakci jsme použili oligonukleotidy JK013 a JK012. JK013 je komplementární k části sekvence uvnitř JanusK a JK012 je komplementární k části sekvence na chromozomu nacházející se mimo rekombinovanou oblast. Vznikl produkt o očekávané velikosti 1629 pb. Pro negativní kontroly jsme jako templát zvolili chromozomální DNA merodiploidních kmenů Sp217 a Sp245 a oligonukleotidy JG28 a JG29 pro amplifikaci JanusK. Podle analýzy elektroforetogramu (Obr. 5.13) z kontrolní PCR proběhla integrace konstruktů JanusK $\Delta glmM$  správně a vzniklé produkty odpovídají očekávané velikosti.



Obr. 5.12: Graf vyjadřující transformační účinnost u kmenů Sp217 (Sp1 *bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG*) a Sp245 (Sp225 *bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG*) v přítomnosti různých koncentrací ZnCl<sub>2</sub> po transformaci konstruktem Janus $\Delta glmM$

Transformační účinnost je vyjádřena procentuálním poměrem získaných transformantů na miskách se selekčním antibiotikem oproti celkovému počtu narostlých kolonií na miskách bez antibiotika.



**Obr. 5.13: Elektroforetogram kontrolní PCR - ověření integrace konstruktu JanusKΔglmM do chromozomu *S. pneumoniae***

**A) 1:** Kmen Sp217 - nevznikl žádný produkt, neboť v tomto kmeni není vložena sekvence JanusK (negativní kontrola); **2-3:** Kmen Sp261 (Sp1 ΔglmM::*janus/bgaA*::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG) klony 1-2 - vznikl produkt o předpokládané velikosti 2475 pb; **4-5:** Kmen Sp263 (Sp225 ΔglmM::*janus/bgaA*::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG) klony 1-2 - vznikl produkt o předpokládané velikosti 2475 pb

**B) 1:** Kmen Sp245 - nevznikl žádný produkt, neboť v tomto kmeni není vložena sekvence JanusK (negativní kontrola); **2-3:** Kmen Sp261 (Sp1 ΔglmM::*janus/bgaA*::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG) klony 1-2 - vznikl produkt o předpokládané velikosti 1629 pb; **4-5:** Kmen Sp263 (Sp225 ΔglmM::*janus/bgaA*::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG) klony 1-2 - vznikl produkt o předpokládané velikosti 1629 pb

**M** - standard molekulových hmotností 1 kb

Použitý kmen	Genotyp	Získaný kmen	Genotyp
<b>Sp1</b>	(Rx derivát; <i>strI</i> , <i>hexA</i> ) (WT)	žádné transformanty	—
<b>Sp225</b>	(R6; gen <i>rpsI</i> z Rx derivátu) (WT)	žádné transformanty	—
<b>Sp217</b>	Sp1 <i>bgaA</i> ::P <sub>czcD</sub> -glmM-FLAG	<b>Sp261</b>	Sp1 ΔglmM:: <i>janus/bgaA</i> ::P <sub>czcD</sub> -glmM-FLAG
<b>Sp245</b>	Sp225 <i>bgaA</i> ::P <sub>czcD</sub> -glmM-FLAG	<b>Sp263</b>	Sp225 ΔglmM:: <i>janus/bgaA</i> ::P <sub>czcD</sub> -glmM-FLAG

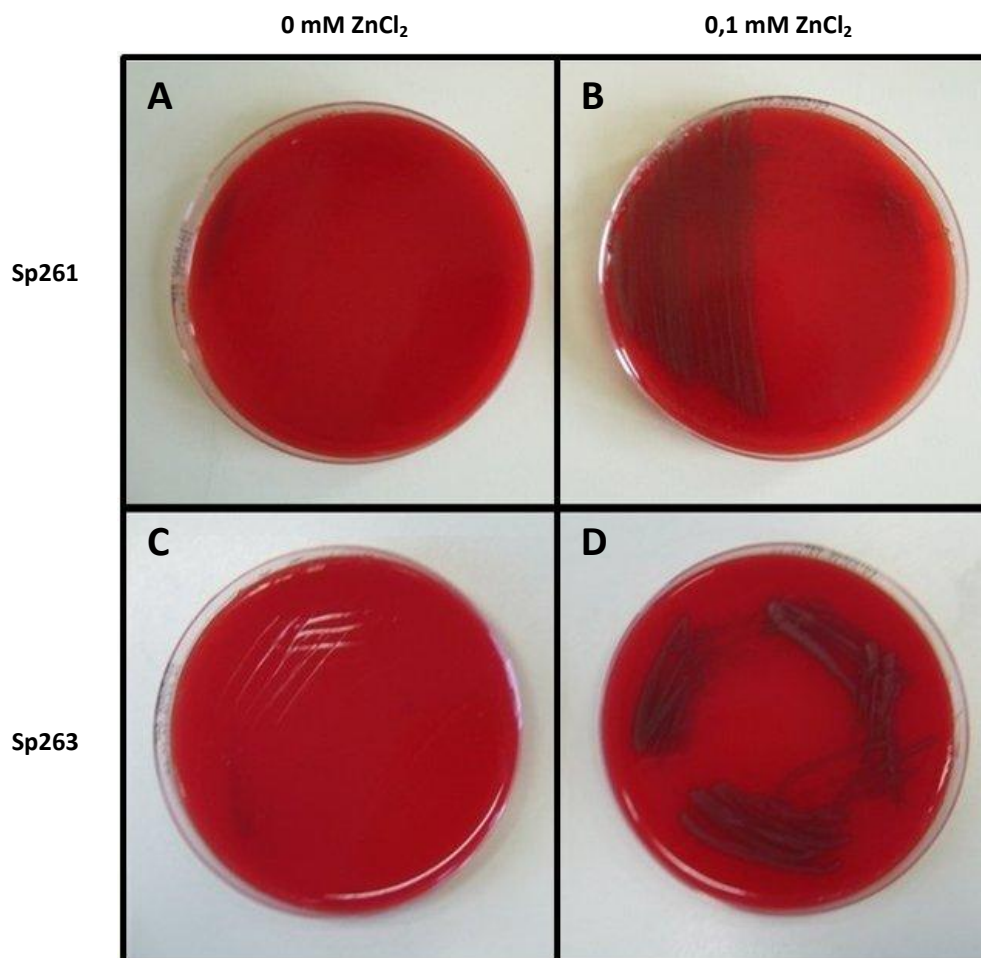
**Tab. 5.1: Shrnutí výsledků transformací konstruktů JanusKΔglmM**

### **5.3 Charakterizace mutantního kmene $\Delta glmM/bgaA::P_{czcD}-glmM-FLAG$**

Kromě testování růstu na pevném médiu jsme v této diplomové práci z časových důvodů pokračovali pouze s mutantním kmenem **Sp261** (Sp1  $\Delta glmM::janus/bgaA::P_{czcD}-glmM-FLAG$ ) a dále jej charakterizovali - testovali jsme schopnost růstu při různých koncentracích  $ZnCl_2$  v C+Y médiu, analyzovali morfologii a také provedli Live/Dead (dále jen L/D) barvení jeho buněčné kultury.

#### **5.3.1 Růst mutantních kmenů Sp261 a Sp263 na pevném médiu**

Abychom otestovali růst mutantních kmenů **Sp261** (Sp1  $\Delta glmM::janus/bgaA::P_{czcD}-glmM-FLAG$ ) a **Sp263** (Sp225  $\Delta glmM::janus/bgaA::P_{czcD}-glmM-FLAG$ ) na pevném médiu, inokulovali jsme suspenze kmenů Sp261 a Sp263 na krevní miskky se selekčním antibiotikem kanamycinem přímo z glycerolových konzerv připravených z kultur Sp261 a Sp263 narostlých v C+Y médiu s přídavkem 0,1 mM  $ZnCl_2$ . Konzervy jsme nejprve stočili, odebrali supernatant, následně pelety resuspendovali v C+Y médiu bez přídavku  $ZnCl_2$  a nakonec každý kmen zaočkovali na dvě miskky bez a s přídavkem 0,1 mM  $ZnCl_2$  (Obr. 5.14).



**Obr. 5.14:** Fotografie krevních misek s kmeny Sp261 (Sp1  $\Delta glmM::janus/bgaA::P_{czcD}-glmM-FLAG$ ) a Sp263 (Sp225  $\Delta glmM::janus/bgaA::P_{czcD}-glmM-FLAG$ ) po 24 h inkubace ve 37°C

**A)** Kmen Sp261 není schopen růst na krevní misce bez přídavku ZnCl<sub>2</sub>. Velmi mírný nárůst na začátku tahu kličkou při inokulaci lze vysvětlit zbytkem ZnCl<sub>2</sub> v glycerolové konzervě.

**B)** Kmen Sp261 na krevní misce s 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub> výrazně narostl.

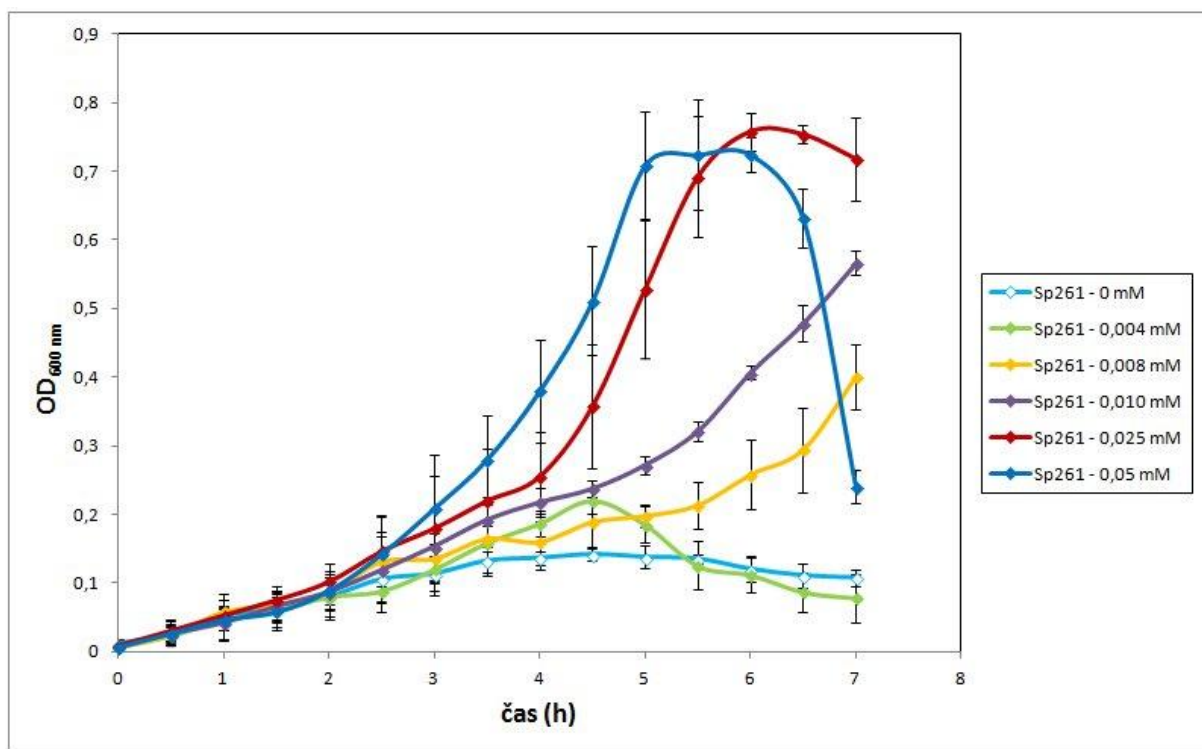
**C, D)** Testováním kmene Sp263 jsme došli ke stejnému výsledku jako v případě kmene Sp261 (Obr. 5.14A, B).

### 5.3.2 Růst mutantního kmene Sp261 v C+Y médiu

Schopnost růstu mutantního kmene Sp261 (Sp1  $\Delta glmM::janus/bgaA::P_{czcD}-glmM-FLAG$ ) jsme testovali v C+Y médiu, přičemž jsme sledovali a porovnávali jeho růst v přítomnosti různých koncentrací ZnCl<sub>2</sub> v médiu, induktoru exprese ektopické kopie genu *glmM*.

Kultivace probíhala tak, že jsme kulturu z glycerolové konzervy zaočkovali do 50 ml vytemperovaného C+Y média na teplotu 37°C s přídavkem  $\text{ZnCl}_2$  o koncentraci 0,05 mM. Kultivace ranního inokula probíhala staticky při teplotě 37°C až do dosažení hodnoty  $\text{OD}_{600} = 0,2$ . Poté jsme kulturu odebrali, rozdělili do mikrozkušavek, centrifugovali (3000 g; 3 min), peletu promyli v C+Y médiu bez přídavku  $\text{ZnCl}_2$  a opět centrifugovali (3000 g; 1,5 min) a následně odebrali zbytek média. Peletu jsme resuspendovali v 1 ml C+Y média s příslušnou koncentrací  $\text{ZnCl}_2$  a inokulovali do zkumavky obsahující 9 ml stejného C+Y média s požadovanou koncentrací  $\text{ZnCl}_2$  a nechali kultivovat staticky při 37°C. Růst v přítomnosti různých koncentrací  $\text{ZnCl}_2$  byl monitorován spektrofotometricky při vlnové délce 600 nm v 30-ti minutových intervalech.

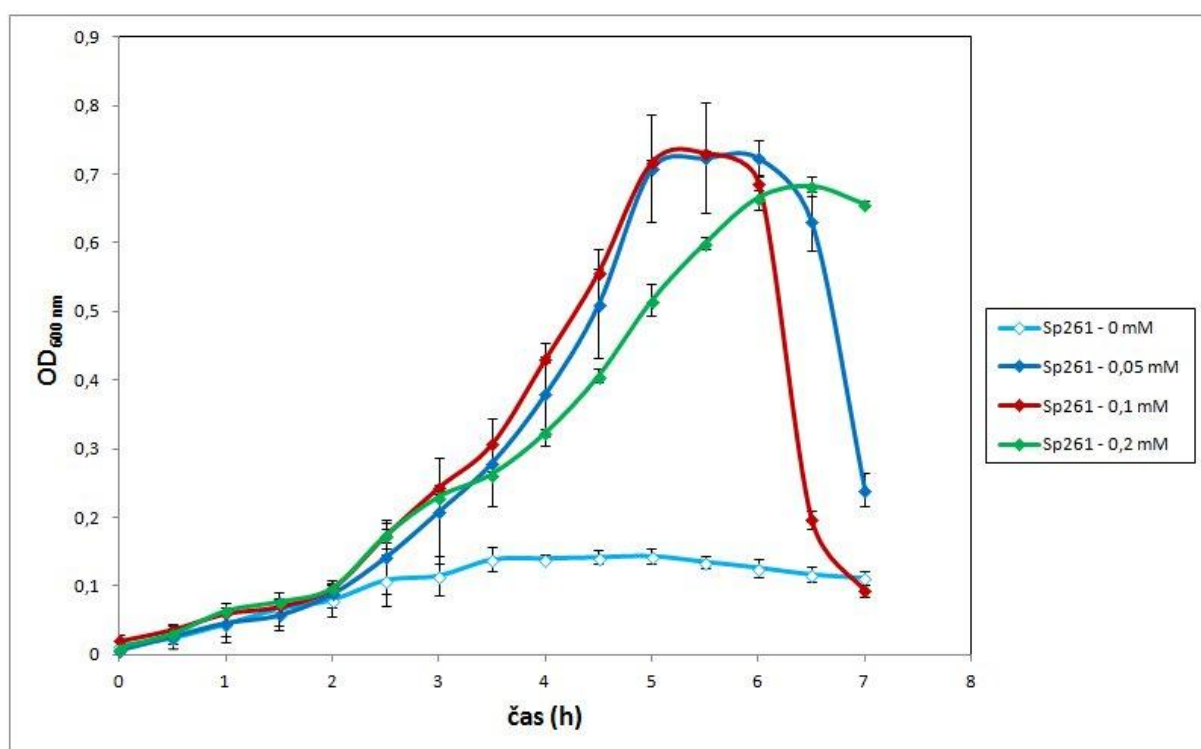
Z porovnání průběhu růstových křivek (Obr. 5.15-16) je jasné patrné, že kultura Sp261 rostoucí v médiu bez přídavku  $\text{ZnCl}_2$  po několika hodinách již neroste. Při koncentraci 0,004 mM  $\text{ZnCl}_2$  je růst kultury velmi omezený a se zvyšující se koncentrací induktoru kultura Sp261 začíná růst a dosahuje optimálního růstu při koncentraci 0,05 mM  $\text{ZnCl}_2$  v médiu (Obr. 5.15).



**Obr. 5.15: Růstové křivky kmene Sp261 (*Sp1  $\Delta\text{glmM}::\text{janus/bgaA}::\text{P}_{\text{czcD}}\text{-glmM-FLAG}$* ) v přítomnosti 0; 0,004; 0,008; 0,010 a 0,025 mM  $\text{ZnCl}_2$  v C+Y médiu**

Graf znázorňuje průměrné hodnoty získané ze tří nezávislých experimentů. Chybové úsečky reprezentují střední chybu průměru.

Při koncentraci 0,1 mM  $\text{ZnCl}_2$  v médiu je růst testovaného mutantního kmene shodný s růstem buněk v koncentraci 0,05 mM  $\text{ZnCl}_2$ , ovšem po dosažení stacionární fáze buňky kultivované v koncentraci 0,1 mM  $\text{ZnCl}_2$  v médiu mnohem rychleji začínají odumírat. Při nejvyšší testované koncentraci 0,2 mM  $\text{ZnCl}_2$  jsme zaznamenali opět zpomalování růstu (Obr. 5.16). Prokázali jsme tedy, že průběh růstu mutantního kmene Sp261 v C+Y médiu závisí na koncentraci přidaného  $\text{ZnCl}_2$ . Kultura rostoucí v přítomnosti 0,05 mM  $\text{ZnCl}_2$  posloužila dále jako kontrolní vzorek, neboť při této koncentraci kultura vykazuje průběh růstu shodný s kmenem divokého typu Sp1 v přítomnosti 0,05 mM  $\text{ZnCl}_2$  (Obr. 5.19).



**Obr. 5.16: Růstové křivky kmene Sp261 (*Sp1 AglmM::janus/bgaA::P<sub>cycD</sub>-glmM-FLAG*) v přítomnosti 0; 0,05; 0,1 a 0,2 mM  $\text{ZnCl}_2$  v C+Y médiu**

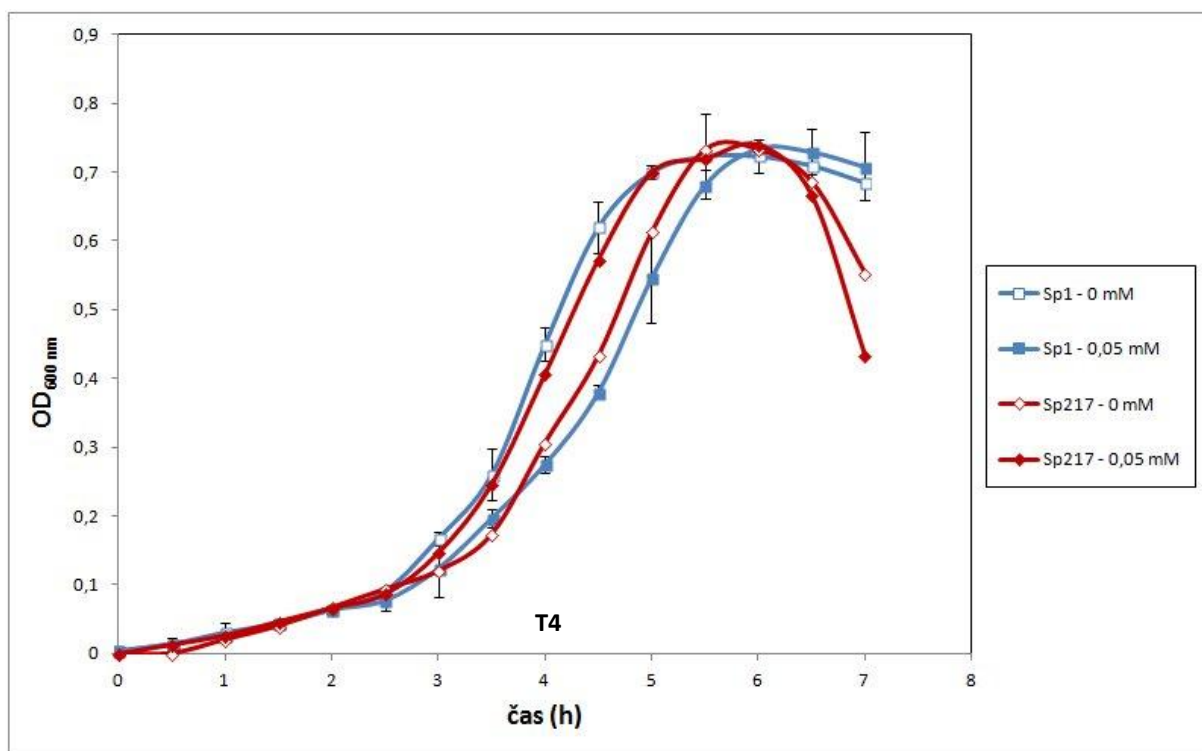
Graf znázorňuje průměrné hodnoty získané ze tří nezávislých experimentů. Chybové úsečky reprezentují střední chybu průměru.

### 5.3.3 Růst a analýza morfologie kmenů Sp1 a Sp217 v C+Y médiu s různými koncentracemi $\text{ZnCl}_2$

Pro charakterizaci růstu a stanovení fenotypu mutantního kmene nadprodukujícího fosfoglukozaminmutázu (GlmM), produkt genu *glmM*, byl použit kmen Sp217 - merodiploid se dvěma kopiemi genu *glmM* na chromozomu - nativní, jejíž exprese probíhá konstitutivně,



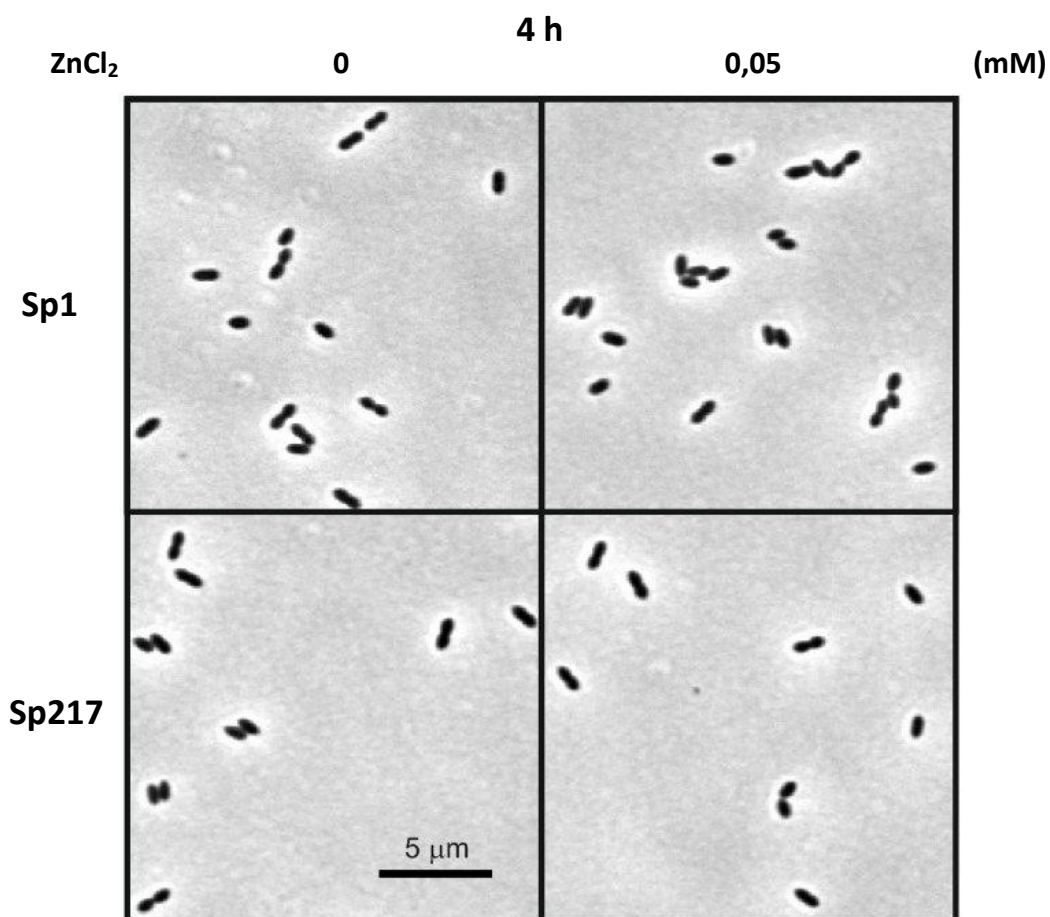
a ektopickou pod kontrolou indukibilního zinkového promotoru. Příprava a testování průběhu růstu u kmenů Sp1 (WT) a Sp217 probíhalo stejným způsobem jako je to popsáno výše (viz kap. 5.3.2). Z porovnání průběhu růstových křivek (Obr. 5.17) je vidět, že kmen Sp1 v médiu s 0,05 mM  $\text{ZnCl}_2$  roste pomaleji než ve stejném médiu bez přidaného  $\text{ZnCl}_2$ .



**Obr. 5.17:** Reprezentativní graf - růstové křivky kmene divokého typu Sp1 a merodiploidního kmene Sp217 (*Sp1 bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG*) kultivovaných v C+Y médiu bez přídavku  $\text{ZnCl}_2$  a v přítomnosti 0,05 mM  $\text{ZnCl}_2$

Merodiploidní kmen Sp217 (*Sp1 bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG*) roste v médiu s přídavkem 0,05  $\text{ZnCl}_2$  mírně rychleji než v médiu bez přídavku  $\text{ZnCl}_2$ . V exponenciální fázi růstu (časový bod T4) jsme odebrali vzorky všech čtyř kultur pro mikroskopickou analýzu morfologie buněk v režimu fázového kontrastu (Obr. 5.18), která ukázala, že buňky kmenů Sp1 a Sp217 vykazují srovnatelnou morfologii, která se s koncentracemi 0 a 0,05 mM  $\text{ZnCl}_2$  v C+Y médiu nemění. Zdá se tedy, že zvýšená produkce proteinu GlmM nemá žádný vliv na buněčnou morfologii.





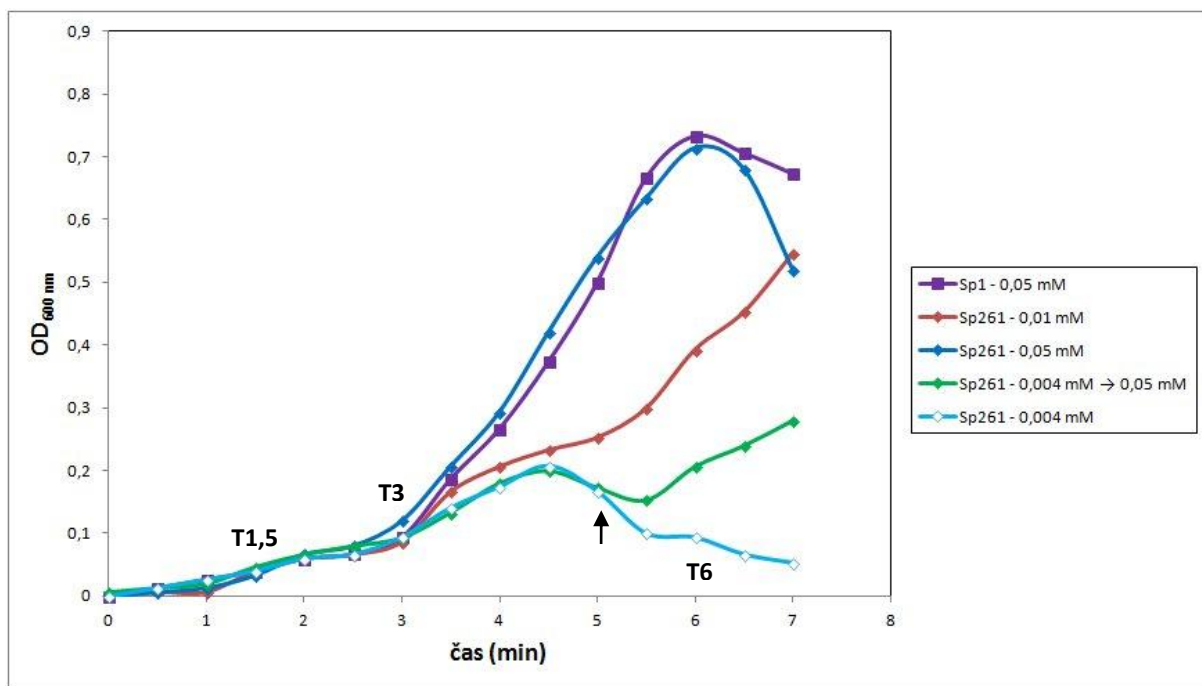
**Obr. 5.18:** Porovnání morfologie buněk kmenů Sp1 a Sp217 v exponenciální fázi růstu (časový bod T4) kultivovaných v C+Y médiu bez přídavku  $\text{ZnCl}_2$  a v přítomnosti 0,05 mM  $\text{ZnCl}_2$ . Mikroskopické snímky byly pořízeny v režimu fázového kontrastu.

#### **5.3.4 Růst, analýza morfologie a L/D barvení mutantního kmene Sp261 v C+Y médiu s různými koncentracemi $\text{ZnCl}_2$**

Z předchozích experimentů týkajících se schopnosti růstu mutantního kmene Sp261 (Sp1  $\Delta\text{glmM}::\text{janus/bgaA}::\text{P}_{\text{czcD}}\text{-glmM-FLAG}$ ) v C+Y médiu v přítomnosti různých koncentrací zinečnatých iontů (Obr. 5.15 a 5.16) jsme zjistili, že růst mutantního kmene Sp261 v C+Y médiu závisí na koncentraci přidaného  $\text{ZnCl}_2$  do média, přičemž při 0 mM  $\text{ZnCl}_2$  kmen téměř neroste a při velmi nízké koncentraci (0,004 mM) je jeho růst stále výrazně limitován a kultura není schopna dosáhnout obvyklých hodnot optické denzity jako kontrolní kultura stejného kmene v přítomnosti 0,05 mM  $\text{ZnCl}_2$  ve stejném médiu.

Abychom zjistili, zda dojde u kmene Sp261 ke komplementaci mutace na úrovni růstu i morfologie buněk, provedli jsme následující experiment. Ranní inokulum, promytí a

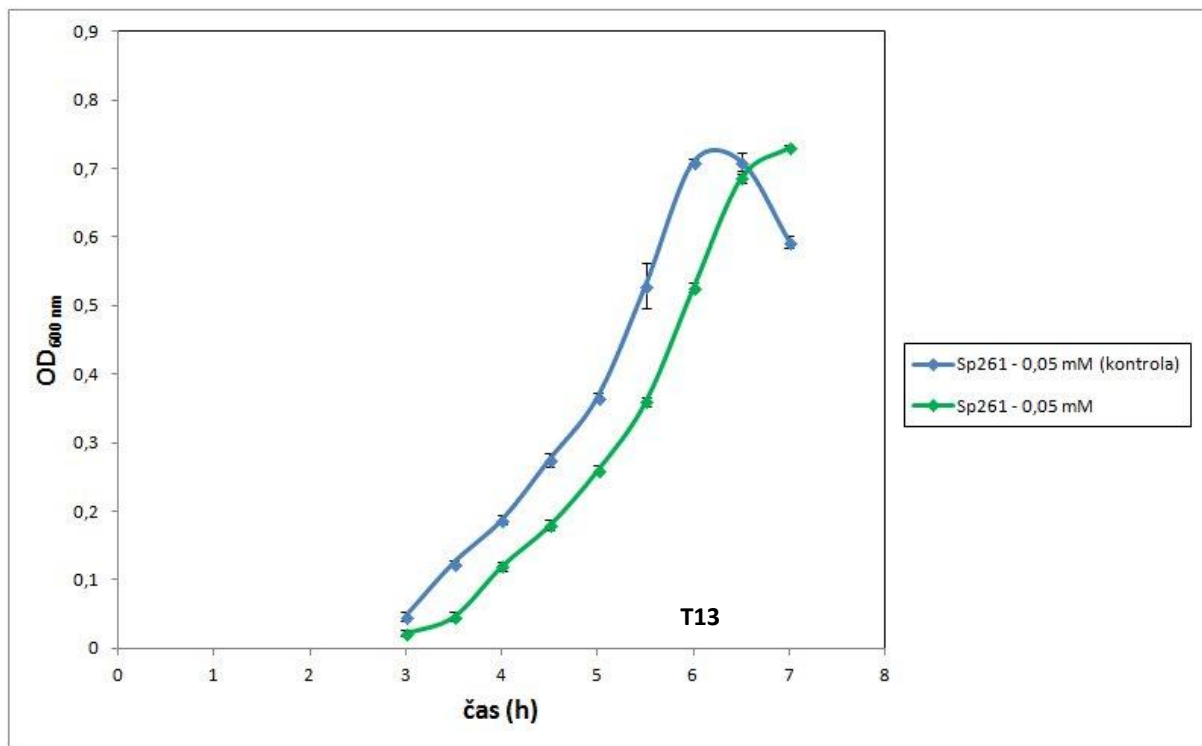
rozdělení kultury při dosažení  $OD_{600} = 0,2$  do čerstvého C+Y média s koncentracemi 0,004 (připraven duplikát); 0,01 a 0,05 mM  $ZnCl_2$  jsme připravili podle postupu viz kap. 5.3.2 a růst monitorovali při vlnové délce 600 nm v pravidelných 30-ti minutových intervalech (Obr. 5.19). Jako kontrola posloužila kultura Sp261 kultivovaná v přítomnosti 0,05 mM  $ZnCl_2$ . Jakmile začala lyzovat buněčná populace kultivovaná v přítomnosti 0,004 mM  $ZnCl_2$ , vyrovnali jsme v jedné ze dvou zkumavek duplikátu koncentraci induktoru na výslednou koncentraci 0,05 mM (0,004 mM  $\rightarrow$  0,05 mM), tedy až na koncentraci použitou u kontrolního vzorku, čímž došlo k obnovení růstu. Naproti tomu kultura ve druhé zkumavce, kterou jsme ponechali dále inkubovat v přítomnosti 0,004 mM induktoru pokračovala v odumírání buněk (Obr. 5.19). Kmen Sp261 kultivovaný v přítomnosti 0,01 mM  $ZnCl_2$  vykazoval výrazně pomalejší růst než kontrolní kmen.



**Obr. 5.19:** Reprezentativní graf - růstové křivky kmene Sp1 a mutantního kmene Sp261 v C+Y médiu v přítomnosti různých koncentrací  $ZnCl_2$ ; T1,5; T3 a T6 označují časové body odběrů kultur; černá šipka označuje časový bod (5. hodina), ve kterém byla koncentrace induktoru doplněna na výslednou koncentraci 0,05 mM (komplementační vzorek).

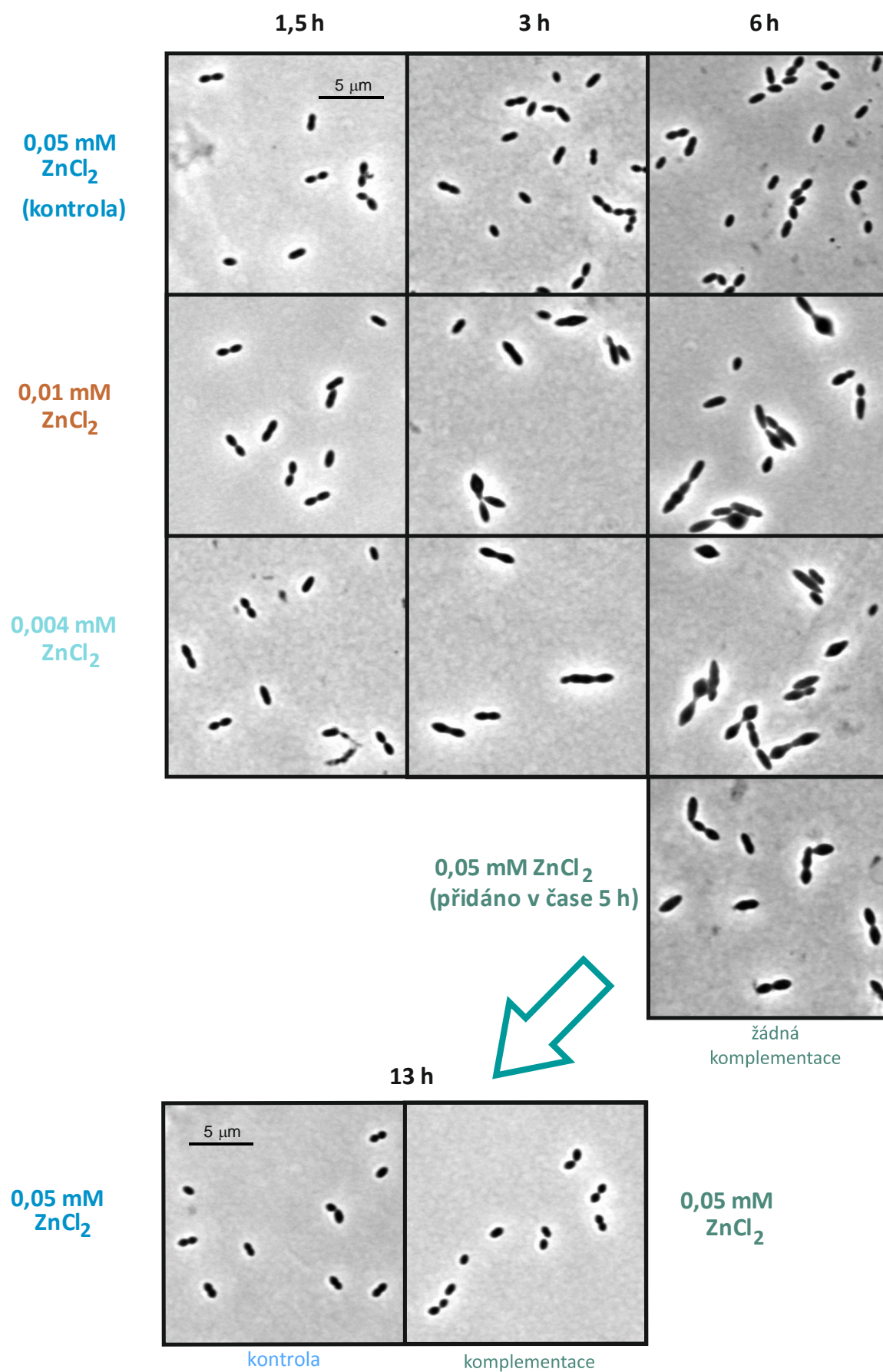
Z důvodu délky experimentu jsme z kultur připravili konzervy v 15% glycerolu a v kultivaci pokračovali následující den (Obr. 5.20) s kontrolní kulturou Sp261 kultivovanou v přítomnosti 0,05 mM  $ZnCl_2$  a kulturou Sp261 (0,004 mM  $\rightarrow$  0,05 mM), u níž byla v čase 5 h vyrovnána koncentrace induktoru na kontrolní koncentraci 0,05 mM. Zjistili jsme časový posun v průběhu růstu kultury Sp261 (0,004 mM  $\rightarrow$  0,05 mM) v porovnání s kontrolou, avšak

doba zdvojení T je u obou kultur stejná (57 min), což znamená, že po přidání zinečnatých iontů k mutantnímu kmeni Sp261 (*Sp1 ΔglmM::janus/bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG*) dochází k úplnému obnovení růstu v porovnání s kontrolní kulturou.



**Obr. 5.20:** Reprezentativní graf - růstové křivky kmene Sp261 v C+Y médiu - kontrolní (modře) a komplementační vzorek (zeleně); T13 označuje časový bod odběru kultury na mikroskopickou analýzu.

Během experimentu jsme provedli mikroskopickou analýzu morfologie v režimu fázového kontrastu. Vzorky byly odebrány ve čtyřech časových bodech: 1,5; 3; 6 a 13 h kultivace (označeno jako T1,5; T3; T6 a T13) (Obr. 5.21). Z obrázků je vidět, že v čase 1,5 h buňky nevykazují žádný morfologický defekt, avšak v čase 3 h buňky Sp261 kultivované při limitních koncentracích induktoru (0,004 a 0,01 mM  $\text{ZnCl}_2$ ) oproti kontrole vykazují morfologické defekty, které se v čase 6 h projevují ještě výrazněji. Objevují se prodloužené buňky nebo vyboulené buňky citrónovitého tvaru. Kontrola (kmen Sp261 kultivovaný v přítomnosti 0,05 mM  $\text{ZnCl}_2$ ) morfologicky odpovídá typickému tvaru kmene divokého typu *S. pneumoniae* Sp1 ve všech analyzovaných časových bodech. Po prodloužené kultivaci po celkově 13 hodinách dochází k obnovení morfologie u komplementačního vzorku Sp261 kultivovaného v přítomnosti 0,05 mM  $\text{ZnCl}_2$  (Obr. 5.21).

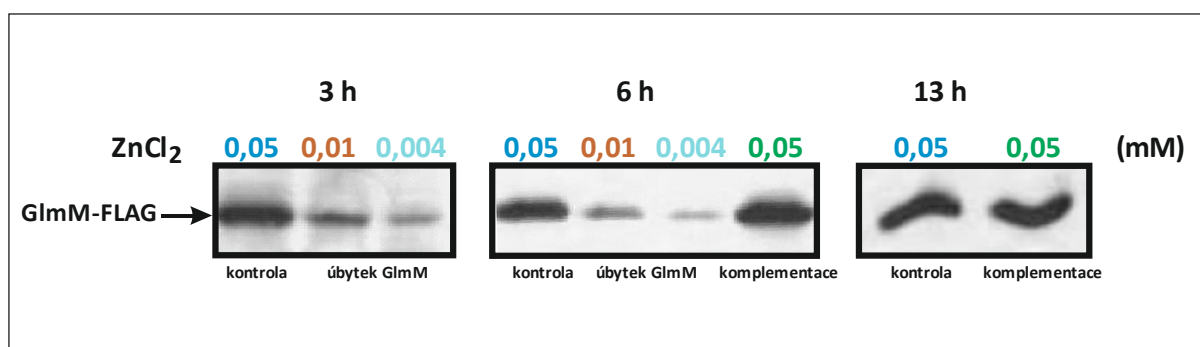


Obr. 5.21: Popis k obrázku se nachází na další straně.

**Obr. 5.21: Porovnání morfologie buněk mutantního kmene Sp261 kultivovaného v C+Y médiu v přítomnosti limitních koncentrací 0,004 a 0,01 mM ZnCl<sub>2</sub> v přítomnosti koncentrace 0,05 mM ZnCl<sub>2</sub> (kontrola a komplementační vzorek)**

Mutantní kmen Sp261 vykazuje morfologické defekty při koncentracích 0,004 mM (světle modrá) i 0,01 mM ZnCl<sub>2</sub> (hnědá barva) v porovnání s kontrolou kultivovanou v přítomnosti koncentrace 0,05 mM ZnCl<sub>2</sub> (tmavě modrá) v časových bodech 3 a 6 h. Z buněčné kultury kontroly a komplementačního vzorku byly připraveny konzervy v 15% glycerolu a v kultivaci se pokračovalo další den. V časovém bodě 13 h je jasně patrná úspěšná komplementace po vyrovnání koncentrace ZnCl<sub>2</sub> na výslednou kontrolní koncentraci 0,05 mM po prodloužené kultivaci (tmavě zelená). Mikroskopické snímky byly pořízeny v režimu fázového kontrastu.

Kromě růstu a morfologie nás také zajímalo, jak se bude za těchto podmínek u mutantního kmene Sp261 vyvíjet produkce proteinu GlmM-FLAG v čase. Za tímto účelem jsme provedli imunodetekci, přičemž jsme využili FLAG-epitopu. Vzorky byly odebrány v časových bodech T3, T6, a T13 (Obr. 5.22), abychom mohli hladinu GlmM-FLAG porovnat. V čase 3 h je patrný úbytek proteinu GlmM-FLAG při limitních koncentracích induktoru (0,004 a 0,010 mM ZnCl<sub>2</sub>) oproti kontrole. V čase 6 h se výsledek v případě limitních koncentrací induktoru shoduje s časovým bodem 3 h, ovšem úbytek hladiny GlmM-FLAG je při limitní koncentraci 0,004 mM ZnCl<sub>2</sub> ještě výraznější. U vzorku, kde byla koncentrace ZnCl<sub>2</sub> vyrovnána na výslednou kontrolní koncentraci 0,05 mM, jsme zaznamenali komplementaci úbytku proteinu GlmM-FLAG, která se projevuje i v čase 13 h.

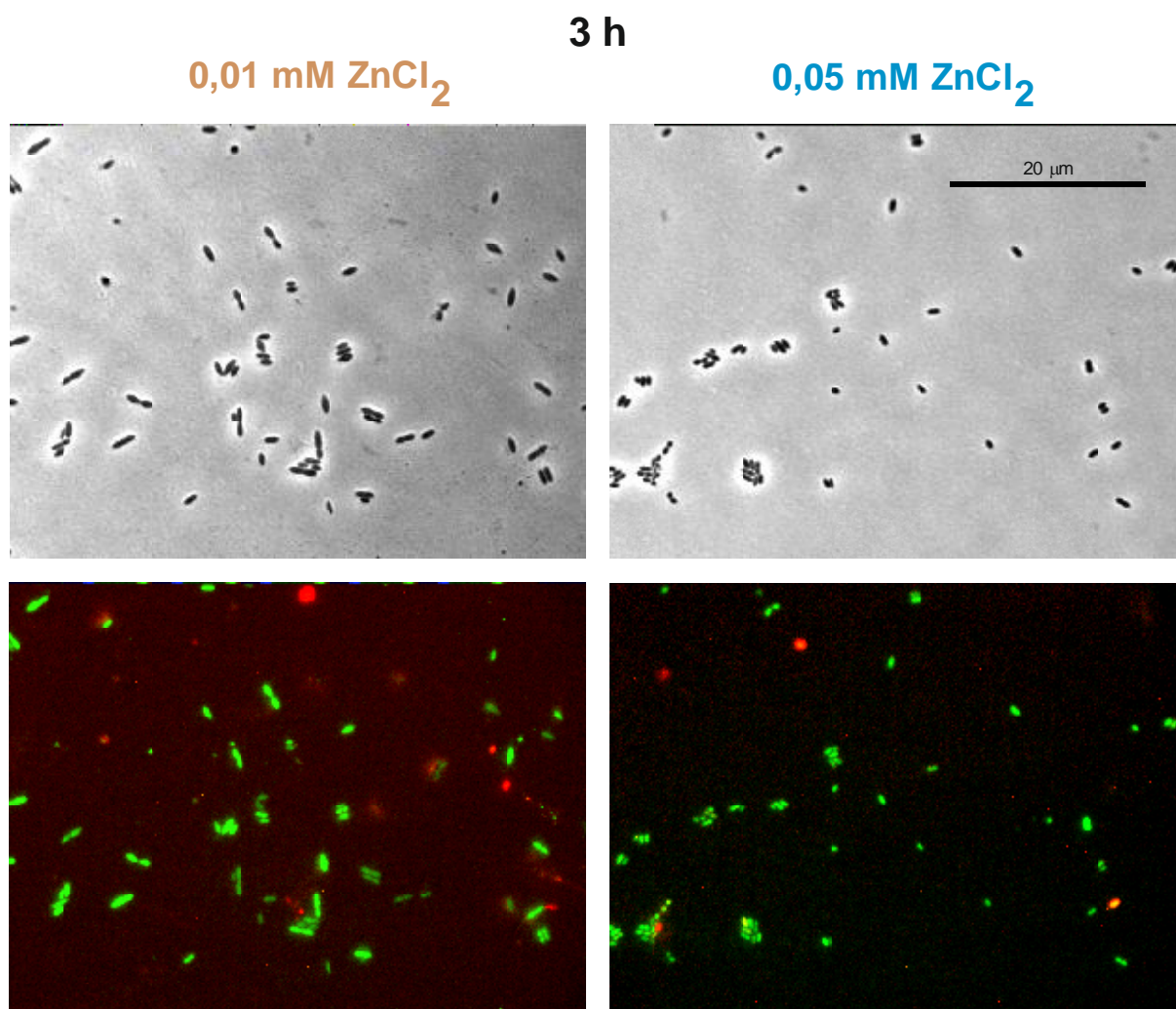


**Obr. 5.22: Imunodetekce proteinu GlmM-FLAG pomocí anti-FLAG protilátky v lyzátech mutantního kmene Sp261. Produkce GlmM-FLAG byla v mutantním kmeni Sp261 indukována různými koncentracemi ZnCl<sub>2</sub> (mM)**

U mutantního kmene Sp261 dochází k úbytku GlmM-FLAG při koncentraci 0,01 mM (hnědá barva) a ještě výrazněji při 0,004 mM ZnCl<sub>2</sub> (světle modrá) v porovnání s kontrolou kultivovanou v přítomnosti koncentrace 0,05 mM ZnCl<sub>2</sub> (tmavě modrá) v časových bodech 3 a 6 h a také k úspěšné komplementaci (časové body 6 a 13 h) po vyrovnání koncentrace ZnCl<sub>2</sub> na výslednou kontrolní koncentraci 0,05 mM po prodloužené kultivaci (tmavě zelená).



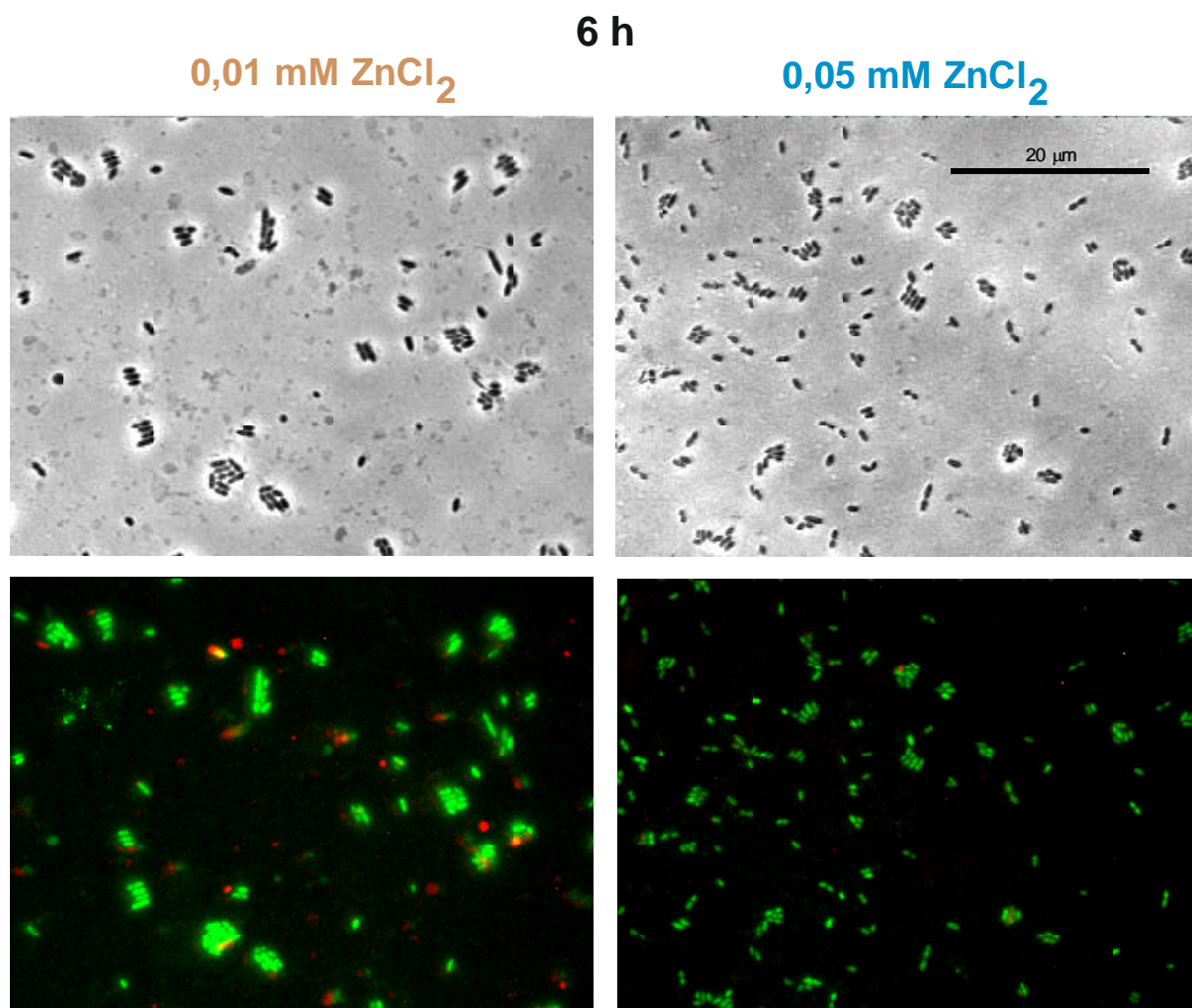
Jelikož je z růstových křivek patrné, že u mutantního kmene Sp261 dochází v přítomnosti limitní koncentrace induktoru ke zpomalení růstu, zajímalo nás, zda-li nemůže být tento defekt spojen se zvýšenou úmrtností buněk. Proto jsme pomocí komerční soupravy (viz Materiál a metodika kap. 4.2.6) provedli L/D barvení buněčné kultury Sp261. L/D barvení umožňuje rozlišit živé a mrtvé buňky ve vzorku. Princip této metody spočívá v použití směsi dvou odlišných fluorescenčních barviv nukleových kyselin s různou schopností průniku do nepoškozených živých buněk. Odběry vzorků pro L/D barvení byly provedeny ve dvou časových bodech T3 (Obr. 5.23) a T6 (Obr. 5.24).



**Obr. 5.23: Live/Dead barvení - porovnání vzorků buněčných kultur kmene Sp261 kultivovaných v C+Y médiu v přítomnosti 0,01 a 0,05 mM ZnCl<sub>2</sub> v čase 3 h**

Snímky ve stupních šedi - **fázový kontrast**

Barevné snímky - **překryv fluorescenčních signálů**: zeleným fluorescenčním barvivem (Syto9) jsou označeny živé buňky, červeným fluorescenčním barvivem (propidium jodid) mrtvé buňky



**Obr. 5.24: Live/Dead barvení - porovnání vzorků buněčných kultur kmene Sp261 kultivovaných v C+Y médiu v přítomnosti 0,01 a 0,05 mM ZnCl<sub>2</sub> v čase 6 h**

Snímky ve stupních šedi - **fázový kontrast**

Barevné snímky - **překryv fluorescenčních signálů**: zeleným fluorescenčním barvivem (Syto9) jsou označeny živé buňky, červeným fluorescenčním barvivem (propidium jodid) mrtvé buňky

Podle předběžných výsledků L/D barvení se z pořízených snímků v režimu fázového kontrastu a překryvu fluorescenčních signálů zdá, že kultura kultivovaná 6 hodin s přidavkem 0,01 mM ZnCl<sub>2</sub> obsahuje více buněčných fragmentů a zbytků buněčných stěn i lyzujících a mrtvých buněk v porovnání s kontrolní kulturou kultivovanou s přidavkem 0,05 mM ZnCl<sub>2</sub>, která lépe prospívá.

Celkové výsledky experimentu (Obr. 5.19-24) lze shrnout tak, že úbytek hladiny GlmM v buňkách dramaticky omezuje jejich růst a ovlivňuje buněčnou morfologii, což je v souladu s detekcí hladiny proteinu GlmM při různých koncentracích induktoru. Dále jsme potvrdili, že komplementace z hlediska růstu i morfologie probíhá u kmene Sp261 úspěšně.

Na základě provedeného L/D barvení se zdá, že buňky s úbytkem hladiny GlmM vykazují zvýšený sklon k lyzi. Tyto výsledky tedy podporují esencialitu enzymu GlmM pro životaschopnost *S. pneumoniae*.

## **5.4. Cílená mutagenese genu *glmM-FLAG***

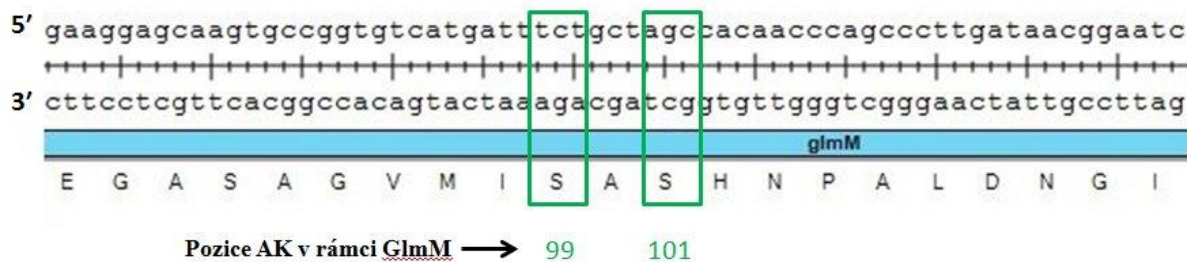
### **5.4.1 Příprava modifikovaných vektorů**

Abychom zjistili, zda je fosforylace GlmM na aminokyselinových zbytcích S99 a S101, které jsou klíčové pro fosforylaci tohoto enzymu *in vitro* (Pallová et al., 2007b), nezbytná pro jeho funkčnost, připravili jsme čtyři plazmidové vektory, odvozené od připraveného plazmidu pZn-GlmM-FLAG (viz kap. 5.1.2), které obsahovaly bodové mutace kodonů v genu *glmM-FLAG* způsobující záměny serinových zbytků S99 a S101 za alanin (S99A a S101A) nebo kyselinu glutamovou (S99E a S101E).

Pro tento účel jsme použili metodu cílené mutagenese (viz Materiál a metodika kap. 4.2.1) a pomocí specificky navržených oligonukleotidů jsme v každé PCR reakci zavedli do genu *glmM-FLAG* na plazmidu pZn-GlmM-FLAG vždy jednu mutaci, která má za následek požadovanou záměnu (Obr. 5.25). Tímto způsobem jsme připravili čtyři modifikované plazmidové vektory, jejichž označení je popsáno níže (Tab. 5.2). Každý z těchto vektorů tak obsahuje mutaci vedoucí ke specifické záměně aminokyseliny - provedli jsme záměnu serinu v poloze 99 nebo 101 za alanin (A) nebo za kyselinu glutamovou (E). Alanin představuje aminokyselinu (AK) neumožňující fosforylaci. Kyselina glutamová je AK, která by měla mimikovat fosforylovaný stav proteinu.



## Část původní sekvence *glmM* zahrnující kodony pro AK 90-110:



### Záměna: serin99 za alanin

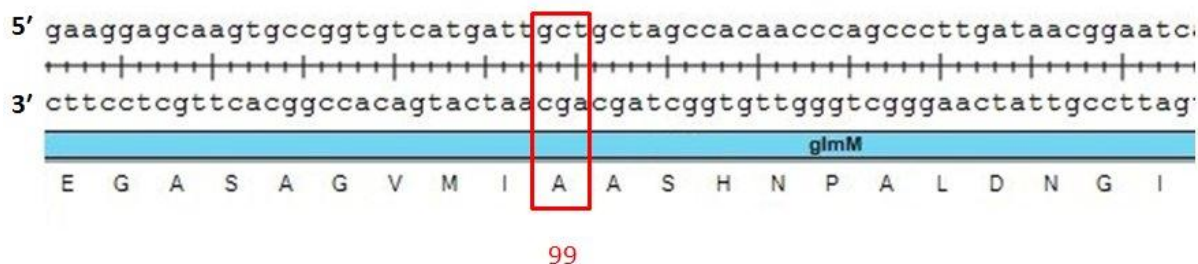
5' - GCAAGTGCCGGTGT CATGATT **GCT** GCTAGCCACA - 3'  
 CCTCGTTCACGGCCACAGTACTAA **AGA** CGATCGGTGTTGG  
 GGAGCAAGTGCCGGTGT CATGATT **TCT** GCTAGCCACAACC  
 3' - CGTTCACGGCCACAGTACTAA **CGA** CGATCGGTGT - 5'

oligonukleotid S99A

část sekvence *glmM* na plazmidovém templátu

oligonukleotid S99A antisense

Výsledek:



### Záměna: serin101 za alanin

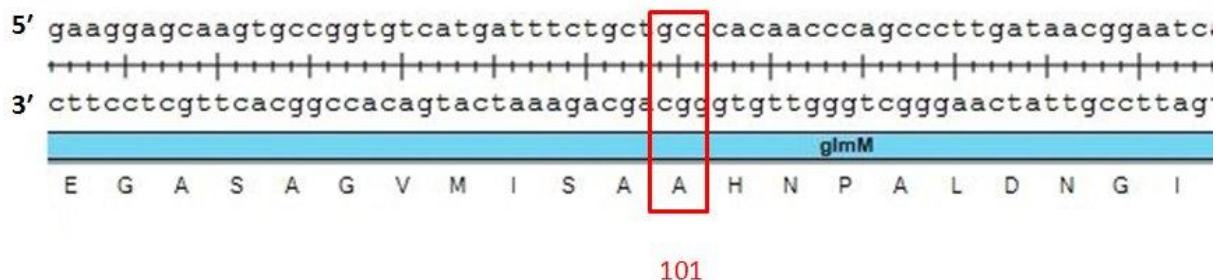
5' - CGGTGTCATGATTTCTGCT **GCC** CACAACCCAGCC - 3'  
 ACGGCCACAGTACTAAAGACGA **TGG** GTGTTGGGTCGGGAA  
 TGCCGGTGT CATGATTTCTGCT **AGC** CACAACCCAGCCCTT  
 3' - GCCACAGTACTAAAGACGA **CGG** GTGTTGGGTCGG - 5'

oligonukleotid S101A

část sekvence *glmM* na plazmidovém templátu

oligonukleotid S101A antisense

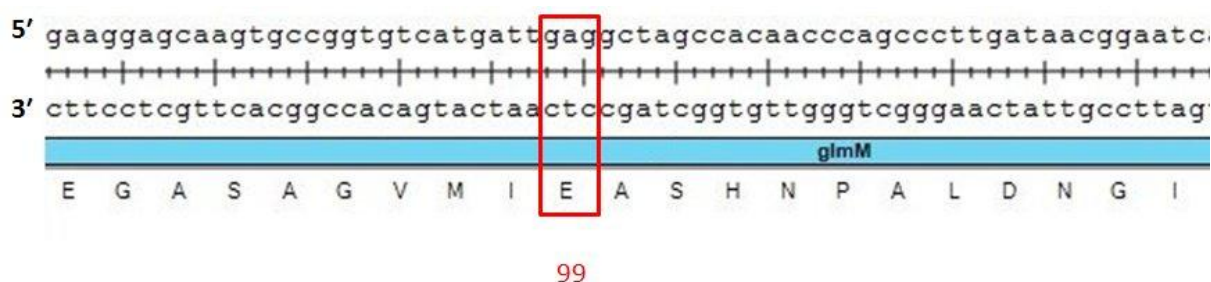
Výsledek:



### Záměna: serin99 za kyselinu glutamovou

5' - GAGCAAGTGCCGGTGTTCATGATT **GAG**GCTAGCCACAACCCAG - 3' oligonukleotid S99E  
|||||  
TTCCTCGTTCACGGCCACAGTACTAA **AGAC**GATCGGTGTTGGGTCGGG část sekvence *glmM* na plazmidovém templátu  
AAGGAGCAAGTGCCGGTGTTCATGATT **TCT**GCTAGCCACAACCCAGCCC  
|||||  
3' - CTCGTTACAGGCCACAGTACTAA **CTC**CGATCGGTGTTGGGTC - 5' oligonukleotid S99E antisense

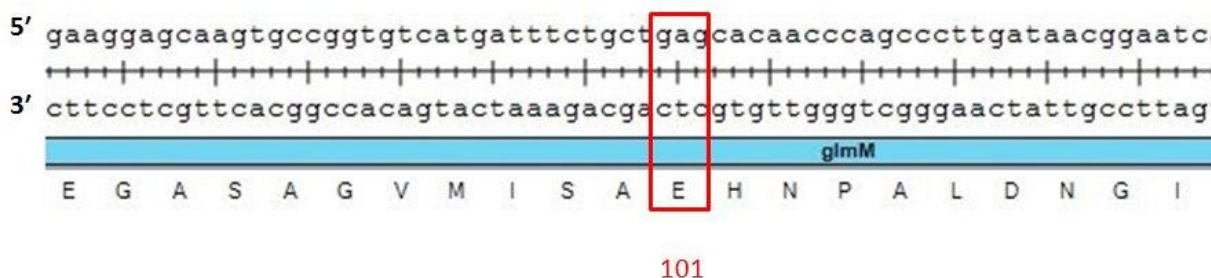
Výsledek:



### Záměna: serin101 za kyselinu glutamovou

5' - CCGGTGTTCATGATTTCTGCT **GAG**CACAACCCAGCCCTTGATAA - 3' oligonukleotid S101E  
|||||  
CACGGCCACAGTACTAAAGACGA **TCG**GTGTTGGGTCGGGAACCTATTGCC část sekvence *glmM* na plazmidovém templátu  
GTGCCGGTGTTCATGATTTCTGCT **AGC**CACAACCCAGCCCTTGATAACGG  
|||||  
3' - GGCCACAGTACTAAAGACGA **CTC**GTGTTGGGTCGGGAACCTATT - 5' oligonukleotid S101E antisense

Výsledek:



Obr. 5.25: Postup při cílené mutagenезi genu *glmM* na plazmidu pZn-GlmM-FLAG, jejímž výsledkem byly čtyři plazmidové vektory s mutacemi v sekvenci *glmM* vedoucími k záměnám serinových zbytků v pozicích 99 a 101 za alanin (A) nebo kyselinu glutamovou (E)

Zelené rámečky a symboly ve vybrané části sekvence genu *glmM* vyznačují původní trojice nukleotidů tvořící kodony pro příslušné AK (A nebo E) a polohu těchto kodonů v rámci celého proteinu GlmM. Červené rámečky a symboly vyznačují trojice nukleotidů tvořící mutované kodony a jejich polohu v rámci celého proteinu GlmM.

Původní kodon → mutovaný kodon (směr 5'→ 3')	Původní AK* → AK zavedená mutací	Označení záměny AK	Označení vytvořeného modifikovaného vektoru
TCT → GCT	serin99 → alanin	S99A	pZn-GlmM-S99A-FLAG
AGC → GCC	serin101 → alanin	S101A	pZn-GlmM-S101A-FLAG
TCT → GAG	serin99 → glutamát	S99E	pZn-GlmM-S99E-FLAG
AGC → GAG	serin101 → glutamát	S101E	pZn-GlmM-S101E-FLAG

**Tab. 5.2:** Shrnutí vytvořených modifikovaných vektorů a mutací zavedených pomocí cílené mutagenese

\* číslo za názvem AK udává její polohu v rámci sekvence GlmM

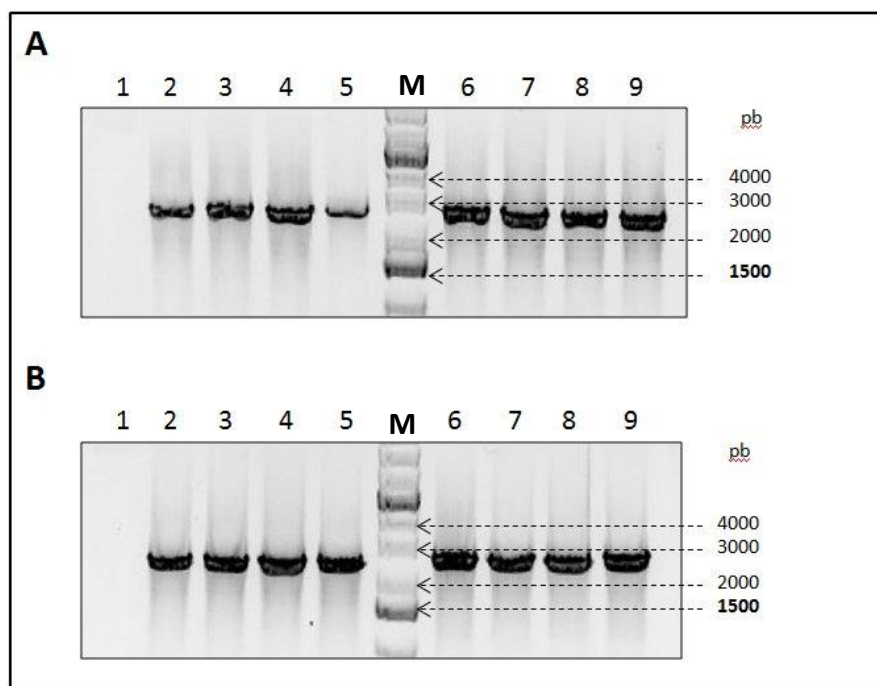
#### 5.4.2 Transformace modifikovaných vektorů do chromozomu *S. pneumoniae* za vzniku merodiploidních kmenů

Za účelem vytvoření merodiploidních kmenů *S. pneumoniae*, které by obsahovaly nativní gen *glmM* a jeho ektopickou kopii s příslušnou mutací způsobující požadovanou záměnu S99 nebo S101, jsme transformovali modifikované plazmidové konstrukty pZn-GlmM-S99A/S101A/S99E/S101E-FLAG (Tab. 5.2) do kmene Sp1 (WT). Vytvořili jsme čtyři merodiploidní kmeny (Tab. 5.3) které jsme selektovali na rezistenci k tetracyklinu.

Vytvořený kmen	Genotyp
<b>Sp268</b>	Sp1 <i>bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-S99A-FLAG</i>
<b>Sp269</b>	Sp1 <i>bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-S101A-FLAG</i>
<b>Sp270</b>	Sp1 <i>bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-S99E-FLAG</i>
<b>Sp271</b>	Sp1 <i>bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-S101E-FLAG</i>

**Tab. 5.3:** Přehled vytvořených merodiploidních kmenů

Integrace konstruktů do chromozomu *S. pneumoniae* proběhla podle schématu (viz. kap. 5.1.3 Obr. 5.5), což jsme zkontrolovali pomocí PCR s oligonukleotidy JK002 a LN142 (viz. kap. 5.1.3 Obr. 5.5). JK002 je komplementární k části sekvence na začátku *glmM* a LN142 je komplementární k části sekvence na chromozomu *S. pneumoniae* mimo rekombinovanou oblast. Jako negativní kontrolu jsme použili chromozomální DNA kmene divokého typu Sp1. Podle analýzy elektroforetogramu proběhla integrace úspěšně (Obr. 5.26).



**Obr. 5.26: Elektroforetogram kontrolní PCR - ověření integrace konstruktů  $P_{czcD}$ -*glmM*-*S99A/S101A/S99E/S101E-FLAG* do chromozomu *S. pneumoniae***

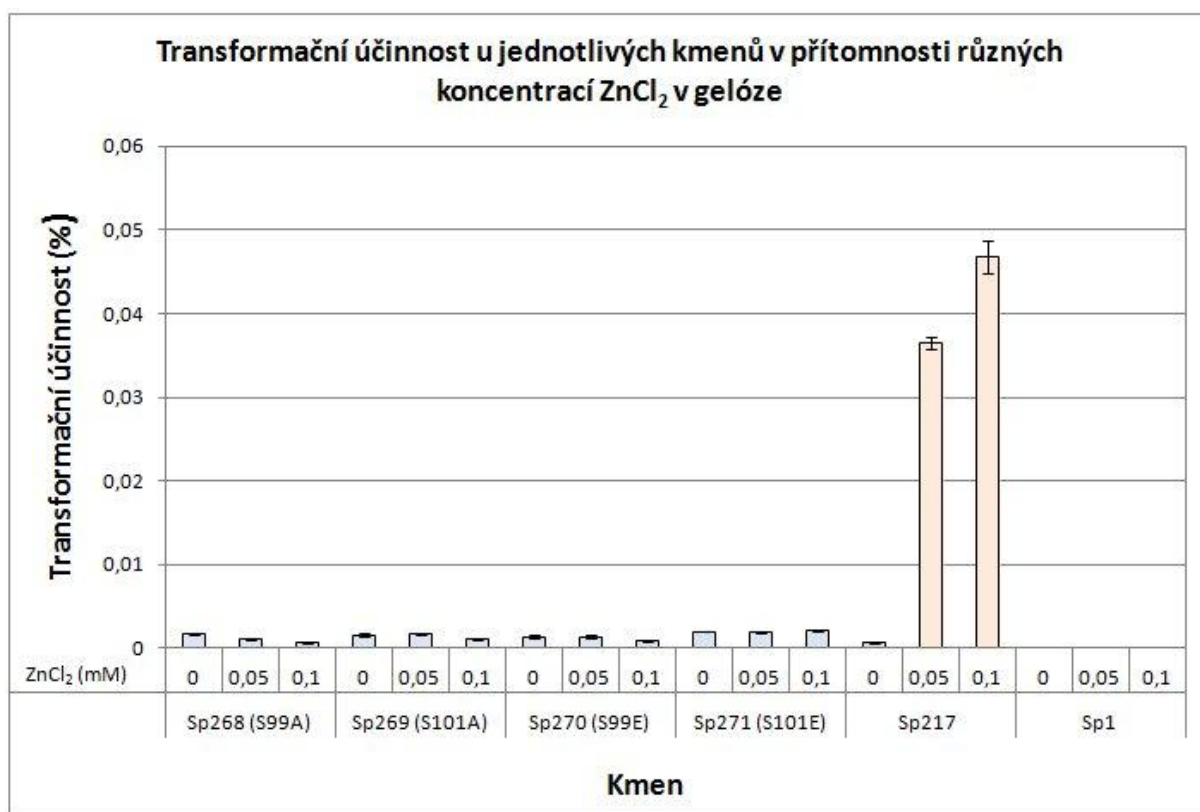
**A) 1:** Kmen Sp1 (WT) - nevznikl žádný produkt, neboť v tomto kmeni není vložena sekvence konstruktů (negativní kontrola); **2-5:** Kmen Sp268 (Sp1 *bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-S99A-FLAG*) klony 1-4; **6-9:** Sp269 (Sp1 *bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-S101A-FLAG*) klony 1-4; **2-9:** vznikl produkt o předpokládané velikosti 2368 pb

**B) 1:** Kmen Sp1 (WT) - nevznikl žádný produkt, neboť v tomto kmeni není vložena sekvence konstruktů (negativní kontrola); **2-5:** Kmen Sp270 (Sp1 *bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-S99E-FLAG*) klony 1-4; **6-9:** Kmen Sp271 (Sp1 *bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-S101E-FLAG*) klony 1-4; **2-9:** vznikl produkt o předpokládané velikosti 2368 pb

**M** - standard molekulových hmotností 1 kb

### 5.4.3 Delece nativní kopie genu *glmM*

Dalším krokem bylo transformovat konstrukt **JanusK $\Delta$ glmM**, navržený pro delecii nativního genu *glmM* *S. pneumoniae* (viz kap. 5.2.3 Obr. 5.11), do připravených merodiploidních kmenů *S. pneumoniae* **Sp268-271**, neboť výsledky této transformace mohou napovědět, zda je fosforylace GlmM na klíčových aminokyselinových zbytcích S99 a S101 pro funkčnost tohoto enzymu esenciální. Jako pozitivní kontrolu jsme použili merodiploidní kmen Sp217 a jako negativní kontrolu kmen divokého typu Sp1 (WT), z něhož jsme žádné transformanty při pokusu o delecii genu *glmM* nezískali (viz kap. 5.2.3). Při transformaci byly do gelózy přidány různé koncentrace induktoru exprese ektopické kopie genu *glmM*  $ZnCl_2$ : 0; 0,05 a 0,1 mM. Transformační účinnost u jednotlivých kmenů je vyjádřena v grafu (Obr. 5.27).



**Obr. 5.27:** Graf vyjadřující transformační účinnost po transformaci konstruktů *JanusAglmM* u kmenů Sp268-271 (Sp1 *bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM S99A/S101A/S99E/S101E-FLAG*) a kmenů Sp1 a Sp217 po transformaci konstruktů *JanusAglmM*.

V závorkách u kmenů Sp268-271 jsou uvedeny záměny klíčových AK zbytků *GlmM*. Merodiploidní kmen Sp217 (Sp1 *bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG*) jsme použili jako pozitivní kontrolu a jako negativní kontrolu kmen Sp1 (WT). Transformační účinnost je vyjádřena procentuálním poměrem získaných transformantů na miskách se selekčním antibiotikem ku celkovému počtu narostlých kolonií na miskách bez antibiotika.

V případě kmene Sp1 (WT) (negativní kontrola) jsme žádné transformanty nezískali. U merodiploidního kmene Sp217 (pozitivní kontrola) závisí transformační účinnost na koncentraci  $ZnCl_2$  v gelóze, přičemž při koncentraci 0 mM je téměř nulová, avšak při 0,05 mM a 0,1 mM  $ZnCl_2$  přesahuje 0,03 %, resp 0,04%. U modifikovaných merodiploidních kmenů Sp268-271, které obsahují pod zinkovým promotorem ektopickou kopii genu *glmM* s mutacemi vedoucími k záměnám serinu 99 nebo 101 za alanin, nebo kyselinu glutamovou, byla transformační účinnost téměř nulová bez ohledu na koncentraci  $ZnCl_2$ . Výsledky této transformace nasvědčují tomu, že fosforylace enzymu *GlmM* na obou serinových zbytcích S99 a S101 je pro funkčnost tohoto enzymu a tedy i pro životaschopnost *S. pneumoniae* esenciální.



## 6. Diskuze

### 6.1 Esencialita fosfoglukozaminmutázy pro životaschopnost *S. pneumoniae*

Genom grampozitivní bakterie *Streptococcus pneumoniae* obsahuje jediný gen kódující jedinou Ser/Thr proteinkinázu eukaryotického typu (eSTK) s označením StkP (Nováková *et al.*, 2005). StkP představuje transmembránový protein, na jehož C-konci se nacházejí čtyři extracelulární PASTA domény, jejichž přítomnost je nepostradatelná pro fosforylační aktivitu této proteinkinázy (Nováková *et al.*, 2010). Na základě nepřímých důkazů (Yeats *et al.*, 2002; Shah *et al.*, 2008; Shah a Dworkin, 2010) a potvrzení vazby synteticky připraveného peptidoglykanu (Maestro *et al.*, 2011) se předpokládá, že PASTA domény váží volné fragmenty peptidoglykanu, které slouží jako signální molekuly. Přestože je StkP zapojena v regulaci mnoha fyziologických procesů, ukázalo se, že pro životaschopnost *S. pneumoniae* není esenciální (Echenique *et al.*, 2004; Sasková *et al.*, 2007). Kmen  $\Delta stkP$  vytváří atypicky prodloužené buňky s poruchou buněčného dělení (Gieffing *et al.*, 2008; Beilharz *et al.*, 2012).

Porovnáním fosfoproteomu divokého kmene *S. pneumoniae* a kmene *S. pneumoniae*  $\Delta stkP$  byla jako jeden z potenciálních substrátů proteinkinázy StkP *in vivo* odhalena fosfoglukozaminmutáza (GlmM). Fosforylaci GlmM proteinkinázou StkP se podařilo jednoznačně prokázat kinázovou reakcí v podmínkách *in vitro* (Nováková *et al.*, 2005; Pallová, 2007b).

GlmM představuje nezbytný enzym v biosyntetické dráze UDP-*N*-acetylglukozaminu, nepostradatelného prekursoru složek bakteriální buněčné stěny (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996). Tento enzym patří do rodiny  $\alpha$ -D-fosfohexomutáz (Shackelford *et al.*, 2004) a byl dosud charakterizován pouze u omezeného počtu bakterií (viz Literární úvod kap. 2.4.2). Nejpodrobnější popis GlmM podaly studie týkající se tohoto enzymu u bakterie *Escherichia coli* (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996; Jolly *et al.*, 1999, 2000), přičemž bylo zjištěno, že pro životaschopnost této gramnegativní bakterie je GlmM esenciální (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996).

V poměrně nedávné době byly u streptokoků *Streptococcus gordonii* a *Streptococcus mutans* provedeny studie prokazující, že GlmM pro životaschopnost těchto bakterií esenciální není a u obou bakterií lze připravit mutantní kmeny vykazující různé defekty nápadné především na úrovni morfologie jako jsou např. dlouhé řetízky buněk (Shimazu *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009) a v případě *S. gordonii* také výrazné defekty buněčného povrchu či defekty

při dělení buněk (Shimazu *et al.*, 2012). Globální studie esenciality genů *S. pneumoniae*, která byla provedena jejich postupnými inzerčními inaktivacemi, zařadila gen kódující fosfoglukozaminmutázu mezi esenciální geny (Thanassi *et al.*, 2002), což se shoduje s výsledkem podobné studie u *Streptococcus sanguinis* (Xu *et al.*, 2011). U *S. pneumoniae* byla provedena ještě další globální studie, která však gen kódující fosfoglukozaminmutázu nezmiňuje (Bijlsma *et al.*, 2007). Poněvadž závěry podobných globálních studií nemusejí s určitostí platit, chtěli jsme experimentálně objasnit, zda je GlmM pro životaschopnost *S. pneumoniae* skutečně esenciální.

Prvním cílem této diplomové práce proto bylo analyzovat esencialitu genu *glmM*, který kóduje enzym GlmM *S. pneumoniae*. Za esenciální gen lze označit takový gen, jehož ztráta je za určitých podmínek letální (Xu *et al.*, 2011). Buňky nejsou schopné delecí či inaktivací takového genu přežít, protože nemají schopnost nahradit funkci produktu tohoto genu jiným genovým produktem nebo ji obejít alternativní drahou (Thanassi *et al.*, 2002).

Jelikož jsme předpokládali, že GlmM je pro životaschopnost *S. pneumoniae* esenciální, a abychom mohli esencialitu genu *glmM* prokázat a zároveň analyzovat vliv úbytku produktu tohoto genu na fenotyp bakterie, bylo třeba před vlastní delecí nativního genu *glmM* nejprve vytvořit merodiploidní kmen obsahující dvě kopie genu *glmM* - nativní a jeho ektopickou kopii pod kontrolou indukibilního systému. K tomuto účelu jsme zvolili integrační vektor pJWV25 (Eberhardt *et al.*, 2009), který představuje plazmid umožňující fúzi rekombinantního genu *glmM* s indukibilním zinkovým promotorem a jeho stabilní vložení do neesenciálního *bgaA* lokusu na chromozomu *S. pneumoniae* prostřednictvím homologní rekombinace. Obdobný postup zvolili také autoři Peters *et al.* (2014) při vytváření mutantního kmene pro analýzu esenciality proteinu PBP2x pro buněčné dělení *S. pneumoniae*.

Jelikož specifická protilátka proti GlmM není komerčně dostupná, sfúzovali jsme gen *glmM* se sekvencí pro FLAG-epitop na C-konci proteinu za účelem detekce přítomnosti rekombinantní GlmM pomocí protilátky anti-FLAG. Do vektoru pJWV25 jsme tedy naklonovali fúzní konstrukt  $P_{czcD}\text{-}glmM\text{-}FLAG$  a vytvořili tak plazmid pZn-GlmM-FLAG, který jsme transformovali do kmene divokého typu Sp1 za vzniku merodiploidního kmene Sp217 (Sp1  $bgaA::P_{czcD}\text{-}glmM\text{-}FLAG$ ). U tohoto merodiploidního kmene jsme testovali expresi proteinu GlmM-FLAG pod kontrolou zinkového promotoru  $P_{czcD}$  v tekutých médiích TSB a C+Y v přítomnosti různých koncentrací  $ZnCl_2$ , induktoru exprese ektopické kopie genu *glmM*. Detekovali jsme protein, který odpovídal velikosti proteinu GlmM-FLAG (47,5 kDa) a zároveň jsme prokázali, že se signál zvyšuje v závislosti na stoupající koncentraci induktoru v médiu, zatímco bez přídavku induktoru nebyl signál detekován.

Produkce GlmM-FLAG v buněčné kultuře kultivované v přítomnosti koncentrace 0,05 mM  $\text{ZnCl}_2$  v C+Y médiu nám připadala optimální. S ohledem na toxicitu zinku pro životaschopnost *S. pneumoniae* jsme zvolili kompromis - tedy koncentraci, při níž je úroveň exprese GlmM-FLAG již detekována, ale není nejvyšší jako v případě koncentrace 0,1 mM  $\text{ZnCl}_2$  (Jacobsen *et al.*, 2011). Poněvadž není dostupná specifická protilátka proti GlmM, nelze v merodiploidním kmeni Sp217 detekovat celkový signál GlmM a tím pádem ani nastavit podmínky pro expresi ektopické kopie genu *glmM*, které by se co nejvíce blížily expresi *glmM* v kmeni divokého typu. Jelikož je koncentrace induktoru v C+Y médiu snadněji kontrolovatelná, neboť je toto médium definovanější, pro další experimenty jsme zvolili C+Y médium, přestože není pro morfologii kmenů odvozených od výchozího kmene divokého typu Sp1 zcela ideální. Avšak porovnáním morfologie buněk merodiploidního kmene Sp217 a kmene Sp1 (WT) v exponenciální fázi růstu kultivovaných v C+Y médiu bez a v přítomnosti koncentrace 0,05 mM induktoru se ukázalo, že zvýšená produkce proteinu GlmM zřejmě nemá žádný vliv na buněčnou morfologii.

Abychom mohli dále analyzovat, jestli je GlmM esenciální pro životaschopnost *S. pneumoniae*, provedli jsme v merodiploidním kmeni Sp217 delecí nativního genu *glmM* transformací lineárním DNA konstruktem *JanusΔglmM* skládajícím se ze dvou okrajových homologních oblastí a Janus kazety uprostřed (Sung *et al.*, 2001) za vzniku mutantního kmene Sp261 (*Sp1 ΔglmM::janus/bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG*). Jelikož jsme předpokládali, že je gen *glmM* pro životaschopnost *S. pneumoniae* esenciální a vyhnuli se případné izolaci transformantů se supresorovými mutacemi, buněčnou suspenzi jsme při transformaci vyseli do gelózy se třemi různými koncentracemi  $\text{ZnCl}_2$  (0; 0,05 a 0,1 mM), induktoru exprese GlmM-FLAG. Zjistili jsme, že transformační účinnost závisí na koncentraci induktoru v gelóze a dosahuje o dva řády vyšších hodnot v porovnání s transformační účinností v gelóze bez přídavku induktoru. To se však liší od skutečnosti, kterou jsme zjistili u kmene Sp245 (*Sp225 bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG*) odvozeného od druhého výchozího kmene divokého typu Sp225 (R6), který jsme dodatečně zařadili až později. U merodiploidního kmene Sp245, z něhož po delecí nativního genu *glmM* vznikl kmen Sp263 (*Sp225 ΔglmM::janus/bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG*), byla na rozdíl od kmene Sp217 transformační účinnost při koncentraci 0,05 mM  $\text{ZnCl}_2$  srovnatelná s transformační účinností v gelóze bez přídavku induktoru. Pro přípravu konzerv jsme si vybrali kolonie narostlé v gelóze v přítomnosti 0,1 mM  $\text{ZnCl}_2$ , kdy kmen Sp245, podobně jako Sp217, dosáhl o dva řády vyšších hodnot transformační účinnosti než v přítomnosti nižší koncentrace zinečnatých iontů. V případě kmenů *S. pneumoniae* divokého typu Sp1 a Sp225 nebyly po transformaci konstruktu *JanusΔglmM* za účelem delece



nativního genu *glmM* získány žádné transformanty ani po 48 hodinách prodloužené inkubace ve 37°C, což podporuje naše pozdější zjištění, že *GlmM* je pro životaschopnost *S. pneumoniae* esenciální.

Růst obou mutantních kmenů jsme testovali na pevném médiu (krevní agar) s a bez přidavku koncentrace 0,1 mM  $\text{ZnCl}_2$ . V obou případech jsme zjistili, že buňky na misce bez přítomnosti  $\text{ZnCl}_2$  nepřežívají, zatímco na misce s 0,1 mM  $\text{ZnCl}_2$  kultura prospívá. Tento výsledek podporuje předpoklad esenciality *GlmM* pro životaschopnost *S. pneumoniae*. Z časových důvodů jsme dále pracovali pouze s mutantním kmenem Sp261. Neznačený mutantní kmen se nám ze stejných důvodů nepodařilo připravit ani u jednoho z kmenů Sp261 a Sp263.

Za účelem analýzy esenciality *GlmM* a minimalizace možnosti výskytu supresorových mutací jsme určili fenotyp způsobený úbytkem *GlmM* u mutantního kmene Sp261. Schopnost růstu mutantního kmene jsme testovali v C+Y médiu v přítomnosti různých koncentrací  $\text{ZnCl}_2$ , přičemž kulturu bylo nejprve nutné kultivovat až do dosažení hodnoty  $\text{OD}_{600} = 0,2$  a následně ji stáčet a poté promývat peletu za účelem odstranění  $\text{ZnCl}_2$ , který byl přítomen v kultivačním médiu. Buněčnou suspenzi jsme následně naředili v C+Y médiu s obsahující příslušnou koncentraci  $\text{ZnCl}_2$ . Porovnáním růstových křivek jsme zjistili, že kultura v médiu bez přidavku induktoru po několika hodinách již neroste a celkově jsme prokázali závislost růstu Sp261 na koncentraci přidaného  $\text{ZnCl}_2$  v C+Y médiu. Kultura rostoucí v přítomnosti 0,05 mM  $\text{ZnCl}_2$  vykazovala průběh růstu shodný s kmenem divokého typu Sp1 v přítomnosti 0,05 mM  $\text{ZnCl}_2$  a použili jsme ji tedy v dalších experimentech jako kontrolní vzorek. Morfologická analýza buněk kmenů Sp1 a Sp217 odhalila srovnatelnou morfologii, která se s koncentracemi 0 a 0,05 mM  $\text{ZnCl}_2$  v C+Y médiu nemění, což nasvědčuje tomu, že zvýšená produkce proteinu *GlmM* nemá na morfologii buněk žádný vliv.

Abychom zjistili, jestli dojde u kmene Sp261 ke komplementaci mutace na úrovni růstu i morfologie buněk, testovali jsme schopnost růstu Sp261 v přítomnosti limitní koncentrace induktoru 0,004 mM  $\text{ZnCl}_2$  (duplikát). Kultura rostoucí v přítomnosti 0,004 mM  $\text{ZnCl}_2$  začala po 4,5 hodinách lyzovat, avšak po vyrovnání koncentrace induktoru na výslednou koncentraci shodnou s kontrolním vzorkem (0,05 mM  $\text{ZnCl}_2$ ) se její růst opět obnovil a v porovnání s kontrolní kulturou nakonec došlo k úplnému obnovení růstu. Jedná se tedy o komplementační vzorek.

Dále nás zajímalo, zda-li a jakým způsobem se úbytek *GlmM* projeví na morfologii *S. pneumoniae*, a proto jsme provedli mikroskopickou analýzu v součinnosti s imunodetekcí. Buňky Sp261 kultivované při limitních koncentracích induktoru (0,004 a 0,01 mM  $\text{ZnCl}_2$ )

zpočátku nevykazovaly žádný morfologický defekt, avšak po třech hodinách kultivace již oproti kontrole vykazovaly morfologické defekty, které byly po šesti hodinách kultivace ještě výraznější. Po prodloužené kultivaci po celkově 13 hodinách dochází u komplementačního vzorku Sp261 kultivovaného v přítomnosti 0,05 mM  $\text{ZnCl}_2$  k obnovení morfologie a podle imunodetekce také hladiny GlmM. Odhalili jsme, že úbytek enzymu GlmM má za následek výrazné omezení růstu buněk vedoucí až k jejich lyzi a způsobuje nápadné morfologické defekty, kdy se objevují prodloužené buňky nebo vyboulené buňky citrónovitého tvaru. Podobnou morfologii u *S. pneumoniae* zaznamenali také autoři Peters *et al.* (2014) při úbytku proteinu PBP2x, jednoho z PBP proteinů této bakterie. PBP2x hraje roli v biosyntéze buněčné stěny a je esenciálním proteinem pro buněčné dělení *S. pneumoniae*. Prodloužený, nepravidelný a poněkud rozšířený tvar buněk oproti normálnímu stavu i vyšší sklon k lyzi se objevuje při úbytku GlmM u bakterie *Mycobacterium smegmatis* (Li *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2013), pro jejíž životaschopnost je GlmM esenciální, což bylo u této bakterie zjištěno s použitím termosenzitivního podmíněně letálního kmene  $\Delta\text{glmM}$  (Li *et al.*, 2012).

Jelikož jsme zjistili, že u mutantního kmene Sp261 dochází v přítomnosti limitní koncentrace induktoru ke zpomalení růstu, zajímalo nás, zda by tento defekt nemohl být spojen se zvýšenou úmrtností buněk. Na základě provedeného L/D barvení buněčné kultury Sp261 ve dvou časových bodech 3 a 6 h se zdá, že kultura obsahuje více buněčných fragmentů, zbytků buněčných stěn i lyzujících a mrtvých buněk než kontrolní kultura kultivovaná v přítomnosti 0,05 mM  $\text{ZnCl}_2$ .

Na základě získaných výsledků lze říci, že na rozdíl od GlmM v případě *S. gordonii* a *S. mutans* je fosfoglukozaminmutáza (GlmM) *S. pneumoniae* pro životaschopnost této bakterie esenciální, což se shoduje s výsledkem globální studie esenciality genů u *S. pneumoniae* (Thanassi *et al.*, 2002) a je také v souladu s podobnou globální studií provedenou u *S. sanguinis* (Xu *et al.*, 2011). Kromě našeho výsledku u GlmM *S. pneumoniae* byla esencialita pro životaschopnost bakterií doposud prokázána u GlmM gramnegativní bakterie *E. coli* (Mengin-Lecreulx a van Heijenoort, 1996), UreC (GlmM) *Helicobacter pylori* (de Reuse *et al.*, 1997) a GlmM mykobakterie *M. smegmatis* (Li *et al.*, 2012). O GlmM *S. pneumoniae* z dřívější nepublikované studie víme, že je schopna komplementovat podmíněně letální kmen *E. coli* GPM83 obsahující na chromozomu inaktivovaný gen *glmM* a jeho funkční kopii na termosenzitivním plazmidu pGMM (Pallová, 2007b). Na plasmidovém vektoru se nacházející gen *ureC* kódující fosfoglukozaminmutázu *H. pylori* je také schopen komplementovat podmíněně letální kmen *E. coli* (de Reuse *et al.*, 1997). V případě bakterie *S. aureus* není důkaz esenciality genu *femD* kódujícího fosfoglukozaminmutázu jednoznačný

(Wu *et al.*, 1996; Jolly *et al.*, 1997; Glanzmann *et al.*, 1999), ale na základě nepřímých důkazů se zdá, že by se u této bakterie mohla vyskytovat alternativní dráha pro syntézu glukozamin-1-fosfátu (Glanzmann *et al.*, 1999).

## **6.2 Esencialita fosforylace serinových zbytků S99 a S101 pro funkčnost GlmM *S. pneumoniae***

Fosforylace představuje jednu z posttranslačních modifikací proteinů. Jedná se o reverzibilní proces katalyzovaný enzymy proteinkinázami, během něhož dochází k přenosu fosfátové skupiny na substrátový protein. Tato kovalentní modifikace může ovlivňovat konformaci i aktivitu substrátových proteinů a hraje tak zásadní roli v signalizaci a regulaci buněčných procesů.

U fosfoglukozaminmutázy (GlmM) *S. pneumoniae* bylo *in vitro* zjištěno, že klíčovým aminokyselinovým zbytkem pro fosforylaci je serin v pozici 101 (S101) a jako další místo fosforylace GlmM prostřednictvím hmotnostní spektrometrie byl určen S99 (Pallová, 2007b). S101 GlmM *S. pneumoniae* odpovídá S102 GlmM *E. coli* (Jolly *et al.*, 1999), kde je však jediným identifikovaným místem fosforylace. Pomocí cílené mutagenese, kdy byl tento aminokyselinový zbytek zaměněn za neutrální alanin (S102A), byla prokázána esencialita S102 pro autofosforylační aktivitu tohoto enzymu (Jolly *et al.*, 2000). S99 GlmM *S. pneumoniae* odpovídá zbytku S100 GlmM *E. coli*, jehož přítomnost je důležitá pro katalytickou aktivitu (Jolly *et al.*, 1999, 2000). Plazmidové vektory, připravené pomocí cílené mutagenese tak, aby docházelo k produkci GlmM buď se záměnou S99A, nebo S101A, byly použity ke komplementačním testům v podmíněně letálním kmeni *E. coli* GPM83 s inaktivovaným genem *glmM* a jeho kopií nesenou na termosenzitivním plazmidu pGMM. Ukázalo se, že ani jedna z obou mutantních forem GlmM nebyla schopna v tomto kmeni *E. coli* GlmM komplementovat. Nemutovaná forma tohoto enzymu přitom GlmM tohoto podmíněně letálního kmene *E. coli* komplementuje. Tyto výsledky dokazují, že oba zbytky jsou pro funkci GlmM *S. pneumoniae* nezbytně důležité (Pallová, 2007b).

Jelikož nás zajímalo, zda je fosforylace na zmíněných zbytcích S99 a S101 pro funkčnost GlmM a zároveň životaschopnost *S. pneumoniae* esenciální, rozhodli jsme se pro přípravu čtyř variant modifikovaných plazmidových vektorů nesoucích pod zinkovým promotorem gen *glmM-FLAG* s mutacemi vedoucími k záměnám zmíněných aminokyselinových zbytků za alanin (A), který neumožňuje fosforylaci, nebo za kyselinu

glutamovou (E), která by měla napodobovat fosforylovaný stav proteinu. Za tímto účelem jsme provedli pomocí PCR cílenou mutagenezi genu *glmM-FLAG* naklonovaném v našem prvně připraveném plazmidu pZn-GlmM-FLAG, který posloužil jako templát. Tím vznikly čtyři modifikované vektory pZn-GlmM-S99A/S101A/S99E/S101E-FLAG, které jsme transformovali do kmene divokého typu Sp1 a vytvořili tak čtyři merodiploidní kmeny Sp268-271 (Sp1 *bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-S99A/101A/99E/101E-FLAG*) obsahující nativní gen *glmM* a pod inducibilním zinkovým promotorem jeho ektopickou kopii s příslušnou mutací pro záměnu jednoho ze dvou zmíněných aminokyselinových zbytků. Tyto merodiploidní kmeny jsme poté transformovali konstruktem JanusKΔ*glmM* za účelem delece nativního genu *glmM* a druhý den vyhodnotili transformační účinnost. Jako pozitivní kontrolu jsme použili merodiploidní kmen Sp217 (Sp1 *bgaA::P<sub>czcD</sub>-glmM-FLAG*) a jako negativní kontrolu kmen divokého typu Sp1. Delece nativního genu *glmM* ve kmenech Sp270, resp. Sp271, které obsahují ektopickou kopii genu *glmM* se záměnami S99E, resp. S101E (tzv. fosfomimetické mutace) nám na jedné straně posloužily jako negativní kontrola, ale poněvadž jsme získali téměř nulovou transformační účinnost a přitom víme, že oba zmíněné serinové zbytky jsou nezbytně důležité pro aktivitu enzymu GlmM *in vitro* (Pallová, 2007b), nepřímo jsme potvrdili esencialitu těchto serinových zbytků pro GlmM také *in vivo*.

Transformační účinnost byla u kmenů Sp268 a Sp269 (záměny serinů za alanin) i u kmenů Sp270 a Sp271 (záměny serinů za kyselinu glutamovou) téměř nulová bez ohledu na koncentraci induktoru v podobě ZnCl<sub>2</sub> přidaného při transformaci do gelózy, zatímco v případě pozitivní kontroly (merodiploidní kmen Sp217) byla téměř nulová pouze v případě 0 mM ZnCl<sub>2</sub>, zatímco při 0,05 mM a 0,1 mM přesáhla 0,03 %, resp. 0,04 %, což jsou relevantní hodnoty, které řádově odpovídají našim předchozím experimentům při těchto koncentracích induktoru v gelóze. U kmene divokého typu Sp1, který posloužil jako negativní kontrola, jsme nezískali žádné transformanty. V případech, kdy jsou hodnoty transformační účinnosti blízké nule se s největší pravděpodobností může jednat o kolonie vzniklé z buněk se supresorovými mutacemi.

Tyto výsledky naznačují, že fosforylace na obou serinových zbytcích je pro funkčnost GlmM, a vlastně zároveň i pro životaschopnost *S. pneumoniae*, esenciální. Jedná se však o nepřímý důkaz. Vhodnějším řešením, které se nám z časových důvodů nepodařilo uskutečnit, by bylo připravit kmeny, z nichž by každý obsahoval variantu modifikovaného genu *glmM* (včetně varianty se záměnami obou serinových zbytků za alaniny zároveň) pod nativním promotorem a nemutovanou formu genu *glmM* pod inducibilním zinkovým promotorem. Takové uspořádání kontroly genové exprese by umožnilo podat přímý důkaz esenciality

fosforylace na serinových zbytcích, neboť by bylo možné tyto kmeny nejprve kultivovat v C+Y médiu s přidavkem induktoru exprese nemutované formy genu *glmM*, po dosažení požadované optické denzity by byl odebraný alikvot kultury promyt a naředěn v C+Y médiu bez přidavku induktoru. Následně bychom mohli průběh růstu porovnávat s kontrolní kulturou, která by byla naředěna v médiu s induktorem. Jelikož naše výsledky nasvědčují tomu, že je fosforylace na obou serinech esenciální pro životaschopnost *S. pneumoniae*, v navrženém experimentu by kultura bez přidavku induktoru neměla růst.

GlmM je substrátem proteinkinázy StkP přinejmenším v podmínkách *in vitro* (Nováková *et al.*, 2005) a podle našich zjištění je esenciální pro životaschopnost *S. pneumoniae*. StkP však pro životaschopnost *S. pneumoniae* esenciální není, neboť se podařilo připravit životaschopné mutantní kmeny pomocí inaktivace i delece genu *stkP* (Echenique *et al.*, 2004; Nováková *et al.*, 2005; Sasková *et al.*, 2007).

Pokud je tedy fosfoglukozaminmutáza (GlmM) *S. pneumoniae* skutečně substrátem proteinkinázy StkP, měl by se u GlmM vyskytovat další fosforylovaný aminokyselinový zbytek, jenž dosud nebyl identifikován, a k fosforylaci GlmM by mohlo docházet ještě pomocí jiného, zatím neznámého, subjektu. Enzym GlmM *S. pneumoniae* se vyskytuje ve třech fosforylovaných izoformách. Hypotézu o přítomnosti dalšího aminokyselinového zbytku důležitého pro fosforylaci GlmM může nepřímo naznačovat skutečnost, že po vyhodnocení fosforylační reakce těchto izoform *in vitro* byla zaznamenána zbytková fosforylace (Pallová, 2007b). To podporuje i výsledek experimentu, kdy byla fosforylovaná GlmM *S. pneumoniae* a rekombinantní GlmM obsahující záměnu S101A štěpena trombinem, sekvenčně specifickou proteázou, za vzniku dvou proteinových štěpů každého z obou enzymů. V případě obou enzymů byly oba dva proteinové štěpy fosforylované, což ukazuje na přítomnost minimálně dvou fosforylovaných aminokyselinových zbytků GlmM (Pallová, 2007b).

Nabízí se tedy více možností pro vysvětlení aktivace GlmM v nepřítomnosti proteinkinázy StkP. Připomeňme, že u GlmM *E. coli* bylo prokázáno, že k aktivaci tohoto enzymu dochází autofosforylací na S102 za určitých podmínek *in vitro* (Jolly *et al.*, 2000). Jakým způsobem dochází k aktivaci GlmM *E. coli in vivo* zatím není známo, avšak byly navrženy následující možnosti: A) K aktivaci dochází autofosforylací, nebo fosforylací prostřednictvím proteinkinázy, přičemž jako zdroj fosfátové skupiny slouží ATP, nebo B) fosforylace probíhá za přítomnosti glukozamin-1,6-bisfosfátu, meziprojektu reakce katalyzované GlmM (Jolly *et al.*, 2000). V dřívější studii bylo prokázáno, že glukozamin-1,6-bisfosfát lze jako potenciální zdroj fosfátové skupiny nahradit glukóza-1,6-bisfosfátem, aniž

by to reakci jakkoli ovlivnilo (Jolly *et al.*, 1999). Jelikož se na chromozomu *S. pneumoniae* nachází gen kódující fosfoglukomutázu (PGM), není vyloučeno, že by se glukóza-1,6-bisfosfát mohla v této bakterii vyskytovat (Pallová, 2007b). Enzym PGM patří stejně jako GlmM do rodiny  $\alpha$ -D-fosfohexomutáz, které sdílejí stejný reakční mechanismus probíhající přes intermediát fosforylovaný na pozicích 1,6 (Shackelford *et al.*, 2004).

Na základě výsledků kinázových reakcí *in vitro* bylo zjištěno, že autofosforylace u GlmM *S. pneumoniae* neprobíhá. Dále bylo *in vitro* zjištěno, že GlmM *S. pneumoniae* může být aktivována v přítomnosti glukóza-6-fosfátu stejně jako fosforylační aktivitou proteinkinázy StkP (Pallová, 2007b), čímž se podařilo v podmínkách *in vitro* potvrdit obě navržené možnosti pro aktivaci GlmM *E. coli in vivo* popsané výše (Jolly *et al.*, 2000).

Na závěr lze vše shrnout tak, že naše dosavadní výsledky ukazují, že fosforylace na obou serinových zbytcích S99 a S101 je esenciální pro funkčnost enzymu GlmM, a tím zároveň pro životaschopnost *S. pneumoniae*. Vzhledem k tomu, že u proteinkinázy StkP esencialita prokázána nebyla (Echenique *et al.*, 2004; Sasková *et al.*, 2007), musí k aktivaci GlmM docházet i jiným způsobem než fosforylací prostřednictvím StkP, přičemž nelze vyloučit, že by mohlo docházet i k autofosforylaci na bazální úrovni pod rozlišovací schopností detekce a nelze též opomenout ani možnost aktivace prostřednictvím glukóza-1,6-bisfosfátu (Pallová, 2007b). Je také možné, že fosforylace enzymu GlmM proteinkinázou StkP slouží spíše k jeho regulaci než aktivaci. Objasnění problematiky fosforylace GlmM *S. pneumoniae* a potvrzení tohoto enzymu jako substrátu StkP *in vivo* ztěžuje navíc skutečnost, že nelze použít specifickou protilátku proti fosfoserinu (anti-pSer) k alternativní identifikaci substrátů StkP, neboť se v této bakterii vyskytuje nadměrné zastoupení fosfoserinových zbytků (Nováková *et al.*, 2010).

## 7. Souhrn

Výsledky této diplomové práce lze shrnout do následujících bodů:

- Fosfoglukozaminmutáza (GlmM) je důležitý enzym biosyntézy buněčné stěny. Abychom zjistili, zda je GlmM esenciální pro životaschopnost *S. pneumoniae*, připravili jsme nejprve vhodný integrační plazmid pZn-GlmM-FLAG nesoucí pod kontrolou inducibilního zinkového promotoru  $P_{czcD}$  gen *glmM*, který kóduje fosfoglukozaminmutázu fúzovanou na C-konci se sekvencí FLAG-epitopu.
- Integrační plazmid jsme transformovali do dvou různých kmenů *S. pneumoniae* divokého typu Sp1 a Sp225 a vytvořili tak merodiploidní kmeny Sp217 a Sp245 obsahující dvě kopie genu *glmM* - nativní gen *glmM* a jeho ektopickou kopii pod kontrolou inducibilního zinkového promotoru, která byla vložena do neesenciálního *bgaA* lokusu na chromozomu *S. pneumoniae*.
- U obou merodiploidních kmenů jsme úspěšně otestovali expresi ektopické kopie genu *glmM* pod zinkovým promotorem v tekutém médiu s přidavkem různých koncentrací  $ZnCl_2$ , který slouží jako induktor exprese *glmM*. Také jsme ověřili, že jejich morfologie zcela odpovídá kmeni divokého typu.
- Dále jsme připravili lineární konstrukt Janus $\Delta glmM$  a transformovali jej do obou merodiploidních kmenů Sp217 a Sp245 za účelem delece nativního genu *glmM* a tímto způsobem jsme vytvořili mutantní kmeny  $\Delta glmM/bgaA::P_{czcD}-glmM-FLAG$ , které jsme nazvali Sp261 a Sp263. Po opakované transformaci konstrukt Janus $\Delta glmM$  do kmenů divokého typu Sp1 a Sp225 jsme nezískali žádné transformanty.
- Fenotyp mutantního kmene Sp261 jsme charakterizovali, přičemž jsme zjistili, že není schopen růst na pevném médiu bez přidavku induktoru pro ektopickou expresi *glmM*. Testování v tekutém médiu v přítomnosti různých koncentrací  $ZnCl_2$  v součinnosti s mikroskopickou analýzou morfologie, L/D barvením a imunodetekcí odhalilo, že úbytek enzymu GlmM v buňkách má za následek výrazné omezení růstu vedoucí až k

jejich lyzi a způsobuje nápadné morfologické defekty. Prokázali jsme, že vyrovnaní hladiny  $\text{ZnCl}_2$ , induktoru ektopické exprese *glmM*, na koncentraci použitou u kontrolního vzorku komplementuje v mutantním kmeni Sp261 všechny zmíněné projevy úbytku GlmM. Tyto výsledky dokládají, že GlmM je pro životaschopnost *S. pneumoniae* esenciální.

- Za účelem zjištění, zda je fosforylace aminokyselinových zbytků S99 a S101 GlmM pro životaschopnost *S. pneumoniae* esenciální, jsme pomocí cílené mutagenese připravili čtyři modifikované plazmidové vektory pZn-GlmM-S99A/S101A/S99E/S101E-FLAG a následně je transformovali do kmene *S. pneumoniae* divokého typu Sp1. Čtyři připravené merodiploidní kmeny, které pod kontrolou zinkového promotoru kódují ektopickou kopii genu kódující GlmM-FLAG, obsahují vždy určitou záměnu jednoho z aminokyselinových zbytků - S99A, S101A, S99E a S101E.
- Do modifikovaných merodiploidních kmenů jsme transformovali lineární konstrukt Janus $\Delta$ *glmM* za účelem delece nativního genu *glmM*. Výsledky transformační účinnosti nasvědčují tomu, že fosforylace GlmM na aminokyselinových zbytcích S99 a S101 je pro funkčnost tohoto enzymu esenciální.



## 8. Seznam použité literatury

**Agarwal, S., Agarwal, S., Pancholi, P., Pancholi, V. (2012)** Strain-specific regulatory role of eukaryote-like serine/threonine phosphatase in pneumococcal adherence. *Infect Immun.* 80(4), 1361-1372.

**Av-Gay, Y., and Everett, M. (2000)** The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* 8(5), 238-244.

**Av-Gay, Y., Jamil, S., Drews, S.J. (1999)** Expression and characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinase PknB. *Infect Immun.* 67(11), 5676-5682.

**Badet, B., Vermoote, P., Haumont, P.Y., Lederer, F., LeGoffic, F. (1987)** Glucosamine synthetase from *Escherichia coli*: purification, properties, and glutamine-utilizing site location. *Biochemistry.* 26(7), 1940-1948.

**Barreteau, H., Kovac, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S., Blanot, D. (2008)** Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev.* 32(2), 168-207.

**Barthe, P., Mukamolova, G.V., Roumestand, C., Cohen-Gonsaud, M. (2010)** The structure of PknB extracellular PASTA domain from *Mycobacterium tuberculosis* suggests a ligand-dependent kinase activation. *Structure.* 18(5), 606-615.

**Beilharz, K., Nováková, L., Fadda, D., Branny, P., Massidda, O., Veening, J.W. (2012)** Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(15), E905-913.

**Beltramini, A.M., Mukhopadhyay, C.D., Pancholi, V. (2009)** Modulation of cell wall structure and antimicrobial susceptibility by a *Staphylococcus aureus* eukaryote like serine/threonine kinase and phosphatase. *Infect. Immun.* 77(4), 1406-1416.

**Bergmann, S., and Hammerschmidt, S. (2006)** Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology.* 152(Pt 2), 295-303.

**Berry, A.M., and Paton, J.C. (1996)** Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 64(12), 5255-5262.

**Bidossi, A., Mulas, L., Decorosi, F., Colomba, L., Ricci, S., Pozzi, G., Deutscher, J., Viti, C., Oggioni, M.R. (2012)** A functional genomics approach to establish the complement of carbohydrate transporters in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One.* 7(3), e33320.

**Bijlsma, J.J., Burghout, P., Kloosterman, T.G., Bootsma, H.J., de Jong, A., Hermans, P.W., Kuipers, O.P. (2007)** Development of genomic array footprinting for identification of conditionally essential genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol.* 73(5), 1514-1524.

Příloha dostupná z:

([www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1828782/bin/aem\\_73\\_5\\_1514\\_\\_index.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1828782/bin/aem_73_5_1514__index.html)).

- Bogaert, D., Hermans, P.W., Adrian, P.V., Rumke, H.C., de Groot, R. (2004)** Pneumococcal vaccines: an update on current strategies. *Vaccine*. 22, 2209-2220.
- Bretl, D.J., Demetriadou, C., Zahrt, T.C. (2011)** Adaptation to environmental stimuli within the host: two-component signal transduction systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 75(4), 566-582.
- Buelow, D.R., Raivio, T.L. (2010)** Three (and more) component regulatory systems - auxiliary regulators of bacterial histidine kinases. *Mol Microbiol*. 75(3), 547-566.
- Burnett, G., and Kennedy, E.P. (1954)** The enzymatic phosphorylation of proteins. *J. Biol. Chem*. 211(2), 969-980.
- Cámara, M., Boulnois, G.J., Andrew, P.W., Mitchell, T.J. (1994)** A neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* has the features of a surface protein. *Infect Immun*. 62(9), 3688-3695.
- Cheng, Q., Campbell, E.A., Naughton, A.M., Johnson, S., Masure, H.R. (1997)** The *com* locus controls genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*. 23(4), 683-692.
- Claverys, J.P., and Havarstein, L.S. (2002)** Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Front Biosci*. 7, d1798-1814
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E. 3rd, Tekaiia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M.A., Rajandream M.A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J.E., Taylor K., Whitehead S., Barrell, B.G. (1998)** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393(6685), 537-544.
- Dai, K., and Lutkenhaus, J. (1991)** *ftsZ* is an essential cell division gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 173(11), 3500-3506.
- Dasgupta, A., Datta, P., Kundu, M., Basu, J. (2006)** The serine/threonine kinase PknB of *Mycobacterium tuberculosis* phosphorylates PBPA, a penicillin-binding protein required for cell division. *Microbiology*. 152(Pt 2), 493-504.
- de Boer, P., Crossley, R., Rothfield, L. (1992)** The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature*. 359(6392), 254-256.
- de Reuse, H., Labigne, A., Mengin-Lecreulx, D. (1997)** The *Helicobacter pylori ureC* gene codes for a phosphoglucosamine mutase. *J Bacteriol*. 179(11), 3488-3493.
- de Verdier, C.H. (1952)** Isolation of phosphothreonine from bovine casein. *Nature*. 170, 804-805.

- Dessen A., Mouz, N., Gordon, E., Hopkins, J., Dideberg, O. (2001)** Crystal structure of PBP2x from a highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolate: a mosaic framework containing 83 mutations. *J. Biol. Chem.* 276, 45106–45112.
- Dintilhac, A., Alloing, G., Granadel, C., Claverys, J.P. (1997)** Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol Microbiol.* 25(4), 727-739.
- Doern, G.V., Brueggemann, A.B., Huynh, H., Wingert, E. (1999)** Antimicrobial resistance with *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 1997–98. *Emerg Infect Dis.* 5(6), 757-765.
- Domenech, M., García, E., Moscoso, M. (2012)** Biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Biotechnol.* 5(4), 455-465.
- Eberhardt, A., Wu, L.J., Errington, J., Vollmer, W., Veening, J.W. (2009)** Cellular localization of choline-utilization proteins in *Streptococcus pneumoniae* using novel fluorescent reporter systems. *Mol Microbiol.* 74(2), 395-408.
- Echenique, J.R., Chapuy-Regaud, S., Trombe, M.C. (2000)** Competence regulation by oxygen in *Streptococcus pneumoniae*: involvement of *ciaRH* and *comCDE*. *Mol Microbiol.* 36(3), 688-696.
- Echenique, J., Kadioglu, A., Romao, S., Andrew, P.W., Trombe, M.C. (2004)** Protein serine/threonine kinase StkP positively controls virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 72, 2434–2437.
- Fabret, C., and Hoch, J.A. (1998)** A two-component signal transduction system essential for growth of *Bacillus subtilis*: implications for anti-infective therapy. *J Bacteriol.* 180, 6375-6383.
- Fadda, D., Santona, A., D'Ulisse, V., Ghelardini, P., Ennas, M.G., Whalen, M.B., Massidda, O. (2007)** *Streptococcus pneumoniae* DivIVA: localization and interactions in a MinCD-free context. *J Bacteriol.* 189(4), 1288-1298.
- Falk, S.P., and Weisblum, B. (2013)** Phosphorylation of the *Streptococcus pneumoniae* cell wall biosynthesis enzyme MurC by a eukaryotic-like Ser/Thr kinase. *FEMS Microbiol Lett.* 340(1), 19-23.
- Fischer, E.H., and Krebs, E.G. (1955)** Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J. Biol. Chem.* 216, 121–132.
- Fiuza, M., Canova, M.J., Zanella-Cleon, I., Becchi, M., Cozzone, A.J., Mateos, L.M., Kremer, L., Gil, J.A., Molle, V. (2008)** From the characterization of the four serine/threonine protein kinases (PknA/B/G/L) of *Corynebacterium glutamicum* toward the role of PknA and PknB in cell division. *J. Biol. Chem.* 283(26), 18099–18112.
- Gaidenko, T.A., Kim, T.J., Price C.W. (2002)** The PrpC serine-threonine phosphatase and PrkC kinase have opposing physiological roles in stationary-phase *Bacillus subtilis* cells. *J. Bacteriol.* 184(22), 6109–6114.

**Galyov, E.E., Håkansson, S., Forsberg, A., Wolf-Watz, H. (1993)** A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature*. 361(6414), 730-732.

**García, P., González, M.P., García, E., López, R., García, J.L. (1999a)** LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol Microbiol*. 31(4), 1275-1281.

**García, P., Paz González, M., García, E., García, J.L., López, R. (1999b)** The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. *Mol Microbiol*. 33(1), 128-138.

**Garnak, M., and Reeves, H.C. (1979)** Phosphorylation of isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Science*. 203(4385), 1111-1112.

**Gieffing, C., Jelencsics, K.E., Gelbmann, D., Senn, B.M., Nagy, E. (2010)** The pneumococcal eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP co-localizes with the cell division apparatus and interacts with FtsZ *in vitro*. *Microbiology*. 156(Pt 6), 1697-1707.

**Gieffing, C., Meinke, A.L., Hanner, M., Henics, T., Bui, M.D., Gelbmann, D., Lundberg, U., Senn, B.M., Schunn, M., Habel, A., Henriques-Normark, B., Ortqvist, A., Kalin, M., von Gabain, A., Nagy, E. (2008)** Discovery of a novel class of highly conserved vaccine antigens using genomic scale antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies. *J Exp Med*. 205(1), 117-131.

**Glanzmann, P., Gustafson, J., Komatsuzawa, H., Ohta, K., Berger-Bächi, B. (1999)** *glmM* operon and methicillin-resistant *glmM* suppressor mutants in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 43(2), 240-245.

**Gordon, E., Mouz, N., Duée, E., Dideberg, O. (2000)** The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. *J. Mol. Biol*. 299(2), 477-485.

**Gosink, K.K., Mann, E.R., Guglielmo, C., Tuomanen, E.I., Masure, H.R. (2000)** Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 68(10), 5690-5695.

**Grundner, C., Gay, L.M., Alber, T. (2005)** *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknB, PknD, PknE, and PknF phosphorylate multiple FHA domains. *Protein Sci*. 14(7), 1918-1921.

**Guenzi, E., Gasc, A.M., Sicard, M.A., Hakenbeck, R. (1994)** A two component signal-transducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol*. 12, 505-515.

**Hakenbeck, R., Brückner, R., Denapaite, D., Maurer, P. (2012)** Molecular mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Future Microbiol*. 7(3), 395-410.

**Hall-Stoodley, L., Hu, F.Z., Gieseke, A., Nistico, L., Nguyen, D., Hayes, J., Forbes, M., Greenberg, D.P., Dice, B., Burrows, A., Wackym, P.A., Stoodley, P., Post, J.C., Ehrlich, G.D., Kerschner, J.E. (2006)** Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA*. 296(2), 202-211.

**Hanks, S.K., Quinn, A.M., Hunter, T. (1988)** The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*. 241(4861), 42-52.

**Havarstein, L.S., G. Coomaraswamy, D.A. Morrison. (1995)** An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 92, 11140–11144.

**Hoskins, J., Alborn, W.E. Jr., Arnold, J., Blaszcak, L.C., Burgett, S., DeHoff, B.S., Estrem, S.T., Fritz, L., Fu, D.J., Fuller, W., Geringer, C., Gilmour, R., Glass, J.S., Khoja, H., Kraft, A.R., Lagace, R.E., LeBlanc, D.J., Lee, L.N., Lefkowitz, E.J., Lu, J., Matsushima, P., McAhren, S.M., McHenney, M., McLeaster, K., Mundy, C.W., Nicas, T.I., Norris, F.H., O'Gara, M., Peery, R.B., Robertson, G.T., Rockey, P., Sun, P.M., Winkler, M.E., Yang, Y., Young-Bellido, M., Zhao, G., Zook, C.A., Baltz, R.H., Jaskunas, S.R., Rosteck, P.R. Jr., Skatrud, P.L., Glass, J.I. (2001)** Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J. Bacteriol.* 183(19), 5709-5717.

**Hui, F.M., and Morrison, D.A. (1991)** Genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: nucleotide sequence analysis shows *comA*, a gene required for competence induction, to be a member of the bacterial ATP-dependent transport protein family. *J Bacteriol.* 173(1), 372-381.

**Hui, F.M., Zhou, L., Morrison, D.A. (1995)** Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: organization of a regulatory locus with homology to two lactococcin A secretion genes. *Gene*. 153(1), 25-31.

**Hussain, H., Branny, P., Allan, E. (2006)** A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase is required for biofilm formation, genetic competence, and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 188(4), 1628-1632.

**Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990)** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96(1), 23-28.

**Jacobsen, F.E., Kazmierczak, K.M., Lisher, J.P., Winkler, M.E., Giedroc, D.P. (2011)** Interplay between manganese and zinc homeostasis in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Metallomics*. 3(1), 38-41.

**Jin, H., and V. Pancholi. (2006)** Identification and biochemical characterization of a eukaryotic-type serine/threonine kinase and its cognate phosphatase in *Streptococcus pyogenes*: their biological functions and substrate identification. *J. Mol. Biol.* 357(5), 1351-1372.

**Jolly, L., Ferrari, P., Blanot, D., van Heijenoort, J., Fassy, F., Mengin-Lecreulx, D. (1999)** Reaction mechanism of phosphoglucosamine mutase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem.* 262(1), 202-210.

- Jolly, L., Pompeo, F., van Heijenoort, J., Fassy, F., Mengin-Lecreulx, D. (2000)** Autophosphorylation of phosphoglucosamine mutase from *Escherichia coli*. J Bacteriol. 182(5), 1280-1285.
- Jolly, L., Wu, S., van Heijenoort, J., de Lencastre, H., Mengin-Lecreulx, D., Tomasz, A. (1997)** The *femR315* gene from *Staphylococcus aureus*, the interruption of which results in reduced methicillin resistance, encodes a phosphoglucosamine mutase. J Bacteriol. 179(17), 5321-5325.
- Juris, S.J., Rudolph, A.E., Huddler, D., Orth, K., Dixon, J.E. (2000)** A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 97(17), 9431-9436.
- Kadioglu, A., Echenique, J., Manco, S., Trombe, M.C., Andrew, P.W. (2003)** The MicAB two-component signaling system is involved in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 71(11), 6676-6679.
- Kang, J., Xu, L., Yang, S., Yu, W., Liu, S., Xin, Y., Ma, Y. (2013)** Effect of phosphoglucosamine mutase on biofilm formation and antimicrobial susceptibilities in *M. smegmatis* *glmM* gene knockdown strain. PLoS One. 8(4), e61589.
- Kato, J., Misra, T.K., Chakrabarty, A.M. (1990)** AlgR3, a protein resembling eukaryotic histone H1, regulates alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 87(8), 2887-2891.
- Kharat, A. S. and Tomasz, A. (2003)** Inactivation of the *srtA* gene affects localization of surface proteins and decreases adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to human pharyngeal cells *in vitro*. Infect Immun. 71, 2758-2765.
- Kristich, C.J., Wells, C.L., Dunny, G.M. (2007)** A eukaryotic-type Ser/Thr kinase in *Enterococcus faecalis* mediates antimicrobial resistance and intestinal persistence. Proc Natl Acad Sci U S A. 104(9), 3508-3513.
- Kundig, W., Ghosh, S., Roseman, S. (1964)** Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phospho-transferase system. Proc Natl Acad Sci U S A. 52, 1067-1074.
- Lacks, S., and Hotchkiss, R.D. (1960)** A study of the genetic material determining an enzyme activity in pneumococcus. Biochim Biophys Acta. 39, 508-517.
- Lange, R., Wagner, C., de Saizieu, A., Flint, N., Molnos, J., Stieger, M., Caspers, P., Kamber, M., Keck, W., Amrein, K.E. (1999)** Domain organization and molecular characterization of 13 two-component systems identified by genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*. Gene. 1999 237(1), 223-234.
- Lara, B., Rico, A.I., Petruzzelli, S., Santona, A., Dumas, J., Biton, J., Vicente, M., Mingorance, J., Massidda, O. (2005)** Cell division in cocci: localization and properties of the *Streptococcus pneumoniae* FtsA protein. Mol Microbiol. 55(3), 699-711.

- Lee, M.S., and Morrison, D.A. (1999)** Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation. *J Bacteriol.* 181(16), 5004-5016.
- Leid, J.G., Willson, C.J., Shirtliff, M.E., Hassett, D.J., Parsek, M.R., Jeffers, A.K. (2005)** The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN- $\gamma$ -mediated macrophage killing. *J. Immunol.* 175(11), 7512–7518.
- Levene, P.A., and Alsberg, C.L. (1906)** The cleavage products of vitellin. *J. Biol. Chem.* 2, 127–133.
- Li, S., Kang, J., Yu, W., Zhou, Y., Zhang, W., Xin, Y., Ma, Y. (2012)** Identification of *M. tuberculosis* Rv3441c and *M. smegmatis* MSMEG\_1556 and essentiality of *M. smegmatis* MSMEG\_1556. *PLoS One.* 7(8), e42769.
- Lipmann, F.A., and Levene, P.A. (1932)** Serinephosphoric acid obtained on hydrolysis of vitellinic acid. *J. Biol. Chem.* 98, 109–114.
- Liu, X.D., Duan, J., Guo, L.H. (2009)** Role of phosphoglucosamine mutase on virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol.* 24(4), 272-277.
- López, R. (2004)** *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages: one long argument. *Int Microbiol.* 7(3), 163-171.
- Luo, P., and Morrison, D.A. (2003)** Transient association of an alternative sigma factor, ComX, with RNA polymerase during the period of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 185(1), 349-358.
- Luo, P., Li, H., Morrison, D.A. (2004)** Identification of ComW as a new component in the regulation of genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 54(1), 172-183.
- Madec, E., Laszkiewicz, A., Iwanicki, A., Obuchowski, M., Séror, S. (2002)** Characterization of a membrane-linked Ser/Thr protein kinase in *Bacillus subtilis*, implicated in developmental processes. *Mol. Microbiol.* 46(2), 571-586.
- Maestro, B., Novaková, L., Hesek, D., Lee, M., Leyva, E., Mobashery, S., Sanz, J.M., Branny, P. (2011)** Recognition of peptidoglycan and  $\beta$ -lactam antibiotics by the extracellular domain of the Ser/Thr protein kinase StkP from *Streptococcus pneumoniae*. *FEBS Lett.* 585(2), 357–363.
- Manai, M. and Cozzone, A.J. (1979)** Analysis of the protein-kinase activity of *Escherichia coli* cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91(3), 819–826.
- Marston, A.L., and Errington, J. (1999)** Selection of the midcell division site in *Bacillus subtilis* through MinD-dependent polar localization and activation of MinC. *Mol Microbiol.* 33(1), 84-96.
- Martin, P.K., Li, T., Sun, D., Biek, D.P., Schmid, M.B. (1999)** Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 181, 3666-3673.

- Mascher, T., Zähler, D., Merai, M., Balmelle, N., de Saizieu, A.B., Hakenbeck, R. (2003)** The *Streptococcus pneumoniae* *cia* regulon: CiaR target sites and transcription profile analysis. *J Bacteriol.* 185(1), 60-70.
- Matsumoto, A., Hong, S.K., Ishizuka, H., Horinouchi, S., Beppu, T. (1994)** Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene.* 146(1), 47–56.
- Mehra-Chaudhary, R., Mick, J., Beamer, L.J. (2011)** Crystal structure of *Bacillus anthracis* phosphoglucosamine mutase, an enzyme in the peptidoglycan biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.* 193(16), 4081-4087.
- Mellroth, P., Daniels, R., Eberhardt, A., Ronnlund, D., Blom, H., Widengren, J., Normark, S., Henriques-Normark, B. (2012)** LytA, the major autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, requires access to the nascent peptidoglycan. *J Biol Chem.* 287(14), 11018–11029.
- Mengin-Lecreulx, D., and van Heijenoort, J. (1993)** Identification of the *glmU* gene encoding N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 175(19), 6150-6157.
- Mengin-Lecreulx, D. and van Heijenoort, J. (1994)** Copurification of glucosamine-1-phosphate acetyltransferase and N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase activities of *Escherichia coli*: characterization of the *glmU* gene product as a bifunctional enzyme catalyzing two subsequent steps in the pathway for UDP-N-acetylglucosamine synthesis. *J Bacteriol.* 176(18), 5788-5795.
- Mengin-Lecreulx, D., and van Heijenoort, J. (1996)** Characterization of the essential gene *glmM* encoding phosphoglucosamine mutase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 271(1), 32-39.
- Miller, M., Donat, S., Rackette, S., Stehle, T., Kouwen, T.R., Diks S.H., Dreisbach, A., Reilman, E., Gronau, K., Becher, D., Peppelenbosch M.P., van Dijk J.M., Ohlsen, K. (2010)** Staphylococcal PknB as the first prokaryotic representative of the prolinedirected kinases. *PLoS One.* 5(2), e9057.
- Morgan, P.J., Hyman, S.C., Byron, O., Andrew, P.W., Mitchell, T.J., Rowe, A.J. (1994)** Modeling the bacterial protein toxin, pneumolysin, in its monomeric and oligomeric form. *J Biol Chem.* 269(41), 25315-25320.
- Morona, J.K., Morona, R., Miller, D.C., Paton, J.C. (2003)** Mutational analysis of the carboxy-terminal (YGX)<sub>4</sub> repeat domain of CpsD, an autophosphorylating tyrosine kinase required for capsule biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 185(10), 3009-3019.
- Morrison, D.A., Lacks, S.A., Guild, W.R., Hageman, J.M. (1983)** Isolation and characterization of three new classes of transformation-deficient mutants of *Streptococcus pneumoniae* that are defective in DNA transport and genetic recombination. *J Bacteriol.* 156(1), 281-290.



**Mougous, J.D., Gifford, C.A., Ramsdell, T.L., Mekalanos, J.J. (2007)** Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Cell Biol.* 9(7), 797–803.

**Muñoz-Dorado, J., Inouye, S., Inouye, M. (1991)** A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell.* 67(5), 995–1006.

**Nariya, H., and Inouye, S. (2003)** An effective sporulation of *Myxococcus xanthus* requires glycogen consumption via Pkn4-activated 6-phosphofructokinase. *Mol Microbiol.* 49(2), 517–528.

**Nariya, H., and Inouye, S. (2005)** Identification of a protein Ser/Thr kinase cascade that regulates essential transcriptional activators in *Myxococcus xanthus* development. *Mol. Microbiol.* 58(2), 367–379.

**Nixon, B.T., Ronson, C.W., Ausubel, F.M. (1986)** Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(20), 7850-7854.

**Nováková L., Bezousková, S., Pompach, P., Spidlová, P., Sasková, L., Weiser, J., Branny, P. (2010)** Identification of multiple substrates of the StkP Ser/Thr protein kinase in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 192(14), 3629–3638.

**Nováková, L., Sasková, L., Pallová, P., Janecek, J., Novotná, J., Ulrych, A., Echenique, J., Trombe, M.C., Branny, P. (2005)** Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and identification of kinase substrates. *FEBS J.* 272, 1243-1254.

**O'Brien, K.L., Wolfson, L.J., Watt, J.P., Henkle, E., Deloria-Knoll, M., McCall, N., Lee E., Mulholland, K., Levine, O.S., Cherian, T.; Hib and Pneumococcal Global Burden of Disease Study Team (2009)** Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet.* 374, 893–902

**Ohlsen, K., Donat, S. (2010)** The impact of serine/threonine phosphorylation in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol.* 300(2-3), 137-141.

**Ortiz-Lombardía, M., Pompeo, F., Boitel, B., Alzari, P.M. (2003)** Crystal structure of the catalytic domain of the PknB serine/threonine kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 278(15), 13094-13100.

**Osaki, M., Arcondéguy, T., Bastide, A., Touriol, C., Prats, H., Trombe, M.C. (2009)** The StkP/PhpP signaling couple in *Streptococcus pneumoniae*: cellular organization and physiological characterization. *J Bacteriol.* 191(15), 4943-4950.

**Ottolenghi, E., and Hotchkiss, R.D. (1962)** Release of genetic transforming agent from pneumococcal cultures during growth and disintegration. *J Exp Med.* 116, 491-519.

**Owen, D.J., Noble, M.E.M., Garman, E.F., Papageorgiou, A.C., Johnson, L.N. (1995)** Two structures of the catalytic domain of phosphorylase kinase: an active protein kinase complexed with substrate analogue and product. *Structure.* 3(5), 467–482.

**Pallová, P. (2007b)** Dimerizace Ser/Thr proteinkinasy eukaryotního typu *Streptococcus pneumoniae* a charakterizace jejího substrátu, fosfoglukosaminmutasy GlmM. Dizertační práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Praha.

**Pallová, P., Hercík, K., Sasková, L., Nováková, L., Branny, P. (2007a)** A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP of *Streptococcus pneumoniae* acts as a dimer in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 355(2), 526-530.

**Pares, S., Mouz, N., Petillot, Y., Hakenbeck, R., Dideberg, O. (1996)** X-ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP2x, a primary penicillin target enzyme. *Nat. Struct. Biol.* 3(3), 284-289

**Paterson, G.K., Blue, C.E., Mitchell, T.J. (2006)** Role of two-component systems in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Med Microbiol.* 55(Pt 4), 355-363.

**Pereira, S.F., Goss, L., Dworkin, J. (2011)** Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75(1), 192-212.

**Perez, J.C., and Groisman, E.A. (2007)** Acid pH activation of the PmrA/PmrB two-component regulatory system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol.* 2007 63(1), 283-293.

**Pérez, J., Castaneda-Garcia, A., Jenke-Kodama, H., Muller, R., Muñoz-Dorado, J. (2008)** Eukaryotic-like protein kinases in the prokaryotes and the myxobacterial kinome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105(41), 15950-15955.

Přílohy dostupné z ([www.pnas.org/content/105/41/15950.long](http://www.pnas.org/content/105/41/15950.long)).

**Pestova, E.V., Havarstein, L.S., and Morrison, D.A. (1996)** Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol Microbiol.* 21, 853-862.

**Peters, K., Schweizer, I., Beilharz, K., Stahlmann, C., Veening, J.W., Hakenbeck, R., Denapaite, D. (2014)** *Streptococcus pneumoniae* PBP2x mid-cell localization requires the C-terminal PASTA domains and is essential for cell shape maintenance. *Mol Microbiol.* 92(4), 733-755.

**Peterson, S., Cline, R.T., Tettelin, H., Sharov, V., Morrison, D.A. (2000)** Gene expression analysis of the *Streptococcus pneumoniae* competence regulons by use of DNA microarrays. *J Bacteriol.* 182(21), 6192-6202.

**Pompeo, F., van Heijenoort, J., Mengin-Lecreulx, D. (1998)** Probing the role of cysteine residues in glucosamine-1-phosphate acetyltransferase activity of the bifunctional GlmU protein from *Escherichia coli*: site-directed mutagenesis and characterization of the mutant enzymes. *J Bacteriol.* 180(18), 4799-4803.

**Rajagopal, L., Clancy, A., Rubens, C.E. (2003)** A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphatase and affect growth, cell segregation, and virulence. *J Biol Chem.* 278(16), 14429-14441.

- Rajagopal, L., Vo, A., Silvestroni, A., Rubens, C.E. (2006)** Regulation of cytotoxin expression by converging eukaryotic-type and two-component signalling mechanisms in *Streptococcus agalactiae*. *Mol. Microbiol.* 62(4), 941–957.
- Reinelt, S., Hofmann, E., Gerharz, T., Bott, M., Madden, D.R. (2003)** The structure of the periplasmic ligand-binding domain of the sensor kinase CitA reveals the first extracellular PAS domain. *J. Biol. Chem.* 278(40), 39189–39196.
- Reizer, J., Bachem, S., Reizer, A., Arnaud, M., Saier, M.H. Jr., Stülke, J. (1999)** Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis - the complete complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* 145(Pt 12), 3419–3429.
- Rigden, D.J., Jedrzejewski, M.J. (2003)** Structures of *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase in complex with chondroitin and chondroitin sulfate disaccharides. Insights into specificity and mechanism of action. *J Biol Chem.* 278(50), 50596-50606.
- Roggiani, M., and Dubnau, D. (1993)** ComA, a phosphorylated response regulator protein of *Bacillus subtilis*, binds to the promoter region of *srfA*. *J. Bacteriol.* 175(10), 3182-3187.
- Salles, C., Créancier, L., Claverys, J.P., Méjean, V. (1992)** The high level streptomycin resistance gene from *Streptococcus pneumoniae* is a homologue of the ribosomal protein S12 gene from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 20(22), 6103.
- Sasková, L., Nováková, L., Basler, M., Branny, P. (2007)** Eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP is a global regulator of gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 189, 4168–4179.
- Sawai, R., Suzuki, A., Takano, Y., Lee, P. C., Horinouchi, S. (2004)** Phosphorylation of AfsR by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene.* 334, 53-61.
- Schultz, C., Niebisch, A., Schwaiger, A., Viets, U., Metzger, S., Bramkamp, M., Bott, M. (2009)** Genetic and biochemical analysis of the serine/threonine protein kinases PknA, PknB, PknG and PknL of *Corynebacterium glutamicum*: evidence for non-essentiality and for phosphorylation of OdhI and FtsZ by multiple kinases. *Mol. Microbiol.* 74(3), 724–741.
- Shackelford, G.S., Regni, C.A., Beamer, L.J. (2004)** Evolutionary trace analysis of the alpha-D-phosphohexomutase superfamily. *Protein Sci.* 13(8), 2130-2138.
- Shah, I.M., and Dworkin, J. (2010)** Induction and regulation of a secreted peptidoglycan hydrolase by a membrane Ser/Thr kinase that detects muropeptides. *Mol. Microbiol.* 75(5), 1232–1243.
- Shah, I.M., Laaberki, M.H., Popham, D.L., Dworkin, J. (2008)** A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. *Cell.* 135(3), 486–496.
- Shimazu, K., Takahashi, Y., Karibe, H., Mitsunashi, F., Konishi, K. (2012)** Contribution of phosphoglucosamine mutase to determination of bacterial cell morphology in *Streptococcus gordonii*. *Odontology.* 100(1), 28-33.

**Shimazu, K., Takahashi, Y., Uchikawa, Y., Shimazu, Y., Yajima, A., Takashima, E., Aoba, T., Konishi, K. (2008)** Identification of the *Streptococcus gordonii glmM* gene encoding phosphoglucosamine mutase and its role in bacterial cell morphology, biofilm formation, and sensitivity to antibiotics. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 53(2), 166-177.

**Silvestroni, A., Jewell, K.A., Lin, W.J., Connelly, J.E., Ivancic, M.M., Tao, W.A., Rajagopal, L. (2009)** Identification of serine/threonine kinase substrates in the human pathogen group B streptococcus. *J Proteome Res.* 8(5), 2563-2574.

**Smith, R.F., and King, K.Y. (1995)** Identification of a eukaryotic-like protein kinase gene in archaeobacteria. *Protein Sci.* 4(1), 126-129.

**Standish, A.J., Strocher, U.H., Paton, J.C. (2005)** The two-component signal transduction system RR06/HK06 regulates expression of *cbpA* in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(21), 7701-7706.

**Standish, A.J., Strocher, U.H., Paton, J.C. (2007)** The pneumococcal two-component signal transduction system RR/HK06 regulates CbpA and PspA by two distinct mechanisms. *J Bacteriol.* 189(15), 5591-5600.

**Sung, C.K., Li, H., Claverys, J.P., Morrison, D.A. (2001)** An *rpsL* cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol.* 67(11), 5190-5196.

**Sung, C.K., and Morrison, D.A. (2005)** Two distinct functions of ComW in stabilization and activation of the alternative sigma factor ComX in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 187(9), 3052-3061.

**Sun, H., and Shi, W. (2001)** Genetic studies of *mrp*, a locus essential for cellular aggregation and sporulation of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 183(16), 4786-4795.

**Sutherland, E.W. Jr., and Wosilait, W.D. (1955)** Inactivation and activation of liver phosphorylase. *Nature.* 175, 169-170.

**Štekerová, N. (2012)** Spr0334, nový protein buněčného dělení u *Streptococcus pneumoniae*. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Praha.

**Tavares, I.M., Jolly, L., Pompeo, F., Leitão, J.H., Fialho, A.M., Sá-Correia, I., Mengin-Lecreulx, D. (2000)** Identification of the *Pseudomonas aeruginosa glmM* gene, encoding phosphoglucosamine mutase. *J Bacteriol.* 182(16), 4453-4457.

**Tavares I.M., Leitão, J.H., Sá-Correia, I. (2003)** Chromosomal organization and transcription analysis of genes in the vicinity of *Pseudomonas aeruginosa glmM* gene encoding phosphoglucosamine mutase. *Biochem Biophys Res Commun.* 302(2), 363-371.

**Tettelin, H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R.T., Haft, D.H., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Gwinn, M., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Peterson, J.D., Umayam, L.A., White, O., Salzberg, S.L., Lewis, M.R., Radune, D., Holtzapple, E., Khouri, H., Wolf, A.M., Utterback, T.R., Hansen, C.L., McDonald, L.A., Feldblyum, T.V., Angiuoli, S., Dickinson, T., Hickey, E.K., Holt, I.E., Loftus, B.J., Yang, F., Smith, H.O., Venter, J.C., Dougherty, B.A., Morrison, D.A., Hollingshead, S.K., Fraser, C.M. (2001)** Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science*. 293(5529), 498-506.

**Thanassi, J.A., Hartman-Neumann, S.L., Dougherty, T.J., Dougherty, B.A., Pucci, M.J. (2002)** Identification of 113 conserved essential genes using a high-throughput gene disruption system in *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 30(14), 3152-3162.

**Ulijasz, A.T., Andes, D.R., Glasner, J.D., Weisblum, B. (2004)** Regulation of iron transport in *Streptococcus pneumoniae* by RitR, an orphan response regulator. *J Bacteriol.* 186(23), 8123-8136.

**Ulijasz, A.T., Falk, S.P., Weisblum, B. (2009)** Phosphorylation of the RitR DNA-binding domain by a Ser-Thr phosphokinase: Implications for global gene regulation in the streptococci. *Mol. Microbiol.* 71, 382–390.

**Wang, J.Y., and Koshland, D.E. Jr. (1978)** Evidence for protein kinase activities in the prokaryote *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 253(21), 7605–7608.

**Ween, O., Gaustad, P., Håvarstein, L.S. (1999)** Identification of DNA binding sites for ComE, a key regulator of natural competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 33(4), 817-827.

**Wu, S., de Lencastre, H., Sali, A., Tomasz, A. (1996)** A phosphoglucomutase-like gene essential for the optimal expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and DNA sequencing. *Microb Drug Resist.* 2(2), 277-286.

**Xu, P., Ge, X., Chen, L., Wang, X., Dou, Y., Xu, J.Z., Patel, J.R., Stone, V., Trinh, M., Evans, K., Kitten, T., Bonchev, D., Buck, G.A. (2011)** Genome-wide essential gene identification in *Streptococcus sanguinis*. *Sci Rep.* 1, 125.  
Příloha dostupná z ([www.nature.com/srep/2011/111020/srep00125/full/srep00125.html](http://www.nature.com/srep/2011/111020/srep00125/full/srep00125.html)).

**Yajima, A., Takahashi, Y., Shimazu, K., Urano-Tashiro, Y., Uchikawa, Y., Karibe, H., Konishi, K. (2009)** Contribution of phosphoglucosamine mutase to the resistance of *Streptococcus gordonii* DL1 to polymorphonuclear leukocyte killing. *FEMS Microbiol Lett.* 297(2), 196-202.

**Yeats, F., Finn, R.D., Bateman, A. (2002)** The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain. *Trends Biochem. Sci.* 27(9), 438.

**Young, T.A., Delagoutte, B., Endrizzi, J.A., Falick, A.M., Alber, T. (2003)** Structure of *Mycobacterium tuberculosis* PknB supports a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases. *Nat. Struct. Biol.* 10(3), 168–174.

**Zheng, J., Knighton, D.R., Xuong, N.H., Taylor, S.S., Sowadski, J.M., Ten Eyck, L.F. (1993)** Crystal structures of the myristylated catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase reveal open and closed conformations. *Protein Sci.* 2(10), 1559–1573.